

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Física “Gleb Wataghin”**

Microscopia de Força Atômica em Materiais Biológicos: Biossensores e Nanoferramentas

Alberto Luís Dario Moreau

Orientadora: Prof^a Dr^a. Mônica Alonso Cotta

Banca Examinadora

Prof. Roberto José Maria Covolan (IFGW/UNICAMP)

Prof. Abner de Siervo (IFGW/UNICAMP)

Prof^a. Renata Antoun Simão (IF/UFRJ)

Prof. Rodrigo Gribel Lacerda (IF/UFGM)

Dissertação apresentada ao Instituto de Física “Gleb Wataghin”
da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Janeiro de 2011

*Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Doutorado defendida
pelo aluno Alberto Luís Dario Moreau e aprovada pela Comissão Julgadora*

Campinas, 28 de janeiro de 2011



Dr^a Mônica Alonso Cotta

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO IFGW - UNICAMP**

M813m	<p>Moreau, Alberto Luis Dario</p> <p>Microscopia de força atômica em materiais biológicos : biossensores e nanoferramentas / Alberto Luis Dario Moreau. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Mônica Alonso Cotta. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física “Gleb Wataghin”.</p> <p>1. Microscopia de força atômica. 2. Espectroscopia de força. 3. Biossensores. 4. Biomateriais. 5. Nanoferramentas. 6. Nanotubos de carbono. 7. Processo de crescimento. 8. Citrus Tristeza Virus. 9. Xylella fastidiosa. I. Cotta, Mônica Alonso. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física “Gleb Wataghin”. III. Título. (vsv/ifgw)</p>
-------	---

- **Título em inglês:** Atomic force microscopy on biological materials : biosensors and nanotools
- **Palavras-chave em inglês (Keywords):**
 - 1. Atomic force microscopy
 - 2. Force spectroscopy
 - 3. Biosensors
 - 4. Biomaterials
 - 5. Nanotools
 - 6. Carbon nanotubes
 - 7. Growth process
 - 8. Citrus Tristeza Virus
 - 9. Xylella fastidiosa
- **Área de Concentração:** Biofísica
- **Titulação:** Doutor em Ciências
- **Banca Examinadora:**
 - Profª Mônica Alonso Cotta
 - Prof. Roberto José Maria Covolan
 - Prof. Abner de Siervo
 - Profª Renata Antoun Simão
 - Prof. Rodrigo Gribel Lacerda
- **Data da Defesa:** 14-01-2011
- **Programa de Pós-Graduação em:** Física



MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **ALBERTO LUÍS DARIO MOREAU – RA 992598**, APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN” DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 14/01/2011.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dra. Mônica Alonso Cotta – DFA/IFGW/UNICAMP

(Orientadora do Candidato)

Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan – DRCC/IFGW/UNICAMP

Prof. Dr. Abner de Siervo - DFA/IFGW/UNICAMP

Prof. Dra. Renata Antoun Simão – CT/UFRJ

Prof. Dr. Rodrigo Gribel Lacerda – DF/UFGM

*Dedico este trabalho a toda a minha família,
especialmente à minha mãe, Maria Therezinha, pelo
apoio e carinho que sempre tiveram por mim.*

Agradecimentos

- À Professora Mônica pela orientação, apoio, paciência e amizade.
- Aos grupos dos professores Lauro (IQ), Dagmar (IB) e Alessandra (Cordeirópolis) pela colaboração e inúmeras discussões.
- À minha mãe Maria Therezinha, aos meus irmãos André, Adolfo e Fábio, e à minha namorada Luíza, que tanto me apoiaram na trajetória deste doutorado.
- Aos meus amigos Jopa, David e Edgard, pelos conselhos e força que me deram para enfrentar os desafios deste projeto.
- Aos colegas do laboratório: João Hermes, Douglas, Murilo, Richard, Duber e Gabriela pelas discussões e companheirismo.
- Aos que já passaram pelo laboratório, mas se tornaram bons amigos: Klaus, José Roberto, Leonardo e Thalita.
- Aos técnicos Antônio (Totó) e Hélio do LPD pelas inúmeras colaborações.
- À Márcia, Flávia, Rosa e Helô pelos serviços burocráticos.
- Ao IFGW pela infraestrutura necessária ao desenvolvimento deste projeto.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro deste trabalho.

Resumo

Na primeira parte deste trabalho, nós investigamos o processo de crescimento de um biofilme de bactérias (*Xylella fastidiosa*) inoculadas sobre lamínulas de vidro. O tamanho e a distância entre os biofilmes foram estudados por imagens de microscopia óptica; e uma análise fractal foi realizada usando conceitos de escala e imagens de AFM. Observamos que biofilmes diferentes mostram características fractais semelhantes, embora as variações na morfologia possam ser identificadas para diferentes estádios de crescimento do biofilme. Dois tipos de padrões estruturais são identificados através da dimensão fractal (D_f) sugerindo que o crescimento do biofilme pode ser entendido como o modelo de Eden nos estágios de formação e no final, enquanto para o estágio de maturação aparecem evidências do modelo DLA (*diffusion-limited aggregation*). Estes resultados foram correlacionados à formação da matriz do biofilme que pode dificultar a difusão dos nutrientes e por isso criar condições para um crescimento DLA.

Ainda com o AFM, fizemos medidas de espectroscopia de força para estudar a interação específica entre antígeno-anticorpo relacionados ao vírus CTV (*citrus tristeza virus*). Para tanto foi realizado o estudo da imobilização deste material biológico nas superfícies da ponta do AFM, e nos substratos planos de Si e InP. Usamos para isto imagens topográficas de AFM, imagens de microscopia eletrônica e ensaios imunoquímicos de ELISA; com isso pudemos confirmar que tanto o antígeno quanto o anticorpo foram imobilizados e que eles continuavam em seus estados nativos. Com as medidas de espectroscopia de força, detectamos que a diferença de força entre as interações específicas (antígeno-anticorpo) e não-específicas (antígeno-antígeno) foi de aproximadamente 60%.

Utilizamos a mesma rotina de preparação em substrato de InP para o desenvolvimento de um biossensor baseado no funcionamento de um transistor FET (*field-effect transistor*). Os anticorpos foram imobilizados na superfície do semicondutor, enquanto doses de antígenos livres eram adicionadas a uma célula líquida que mantinha contato com esta superfície. Com curvas de corrente vs tensão em regiões lineares do dispositivo, estudamos a resposta, a sensibilidade e a especificidade do sensor, obtendo resultados promissores indicando viabilidade no desenvolvimento e no uso do mesmo.

Por fim, estudamos a durabilidade de pontas de AFM com CNT (*carbon nanotube*) encapsulados com carbono amorfo numa amostra padrão semicondutora de pontos quânticos, além de estudar a sua estabilidade em meio líquido. Duas pontas foram estudadas, uma fabricada pelo nosso grupo e outra comercial, fornecida pela empresa americana CDI (*Carbon Design Inovation*). Utilizamos ferramenta de FT (*fourier transform*) para o estudo da resolução das pontas em imagens topográficas de AFM, e verificamos que ambas as pontas duraram mais de 400 imagens tendo uma perda da resolução de $\sim 7\%$ no ar e de $\sim 5\%$ – em relação às medidas a seco – em meio líquido, mostrando a viabilidade de seu uso no estudo de amostras biológicas.

Abstract

We have investigated the growth process of *Xylella fastidiosa* biofilms inoculated on glass. The size and the distance between biofilms were analyzed by optical microscopy images; a fractal analysis was carried out using scaling concepts and Atomic Force Microscopy (AFM) images. We observed that different biofilms show similar fractal characteristics, although morphological variations can be identified for the different biofilm stages. Two types of structural patterns are suggested from the observed fractal dimensions D_f and suggest that the biofilm growth can be understood as an Eden model in the initial and final stages, while diffusion-limited aggregation (DLA) seems to dominate the maturation stage. Changes in the correlation length parallel to the surface were also observed; these results were correlated to the biofilm matrix formation which can hinder nutrient diffusion and thus create conditions to drive DLA growth.

Atomic force spectroscopy was used as a method to investigate the specific antibody-antigen binding using proteins of the CTV (citrus tristeza virus). Subsequently, the chemical processes of covalent immobilization of the used biomolecules to different solid supports – Si_3N_4 AFM Tips, Si and InP plane substrates – was developed and characterized. The verification of the chemical binding process by different methods like AFM topography experiments, electron microscopy and ELISA immunochemical assays showed a successful immobilization of the biomolecules and that they were still in their native state. The analysis of the spectroscopic force data showed a significant difference in binding force between the specific antibody-antigen complexes and the non-specific controls (approximately 60%).

The same chemical immobilization process was used to bind biomolecules to solid InP supports to develop a biosensor based on the field-effect transistor (FET) principle. The same antibodies, as used in atomic force experiments, were immobilized covalently to the semiconductor surface. The antibody-antigen complexation by adding the specific antigens to the functionalized surface was detected through changes in the current vs tension curves of semiconductor sample. The characterization of the electrochemical response, the molecular sensibility and the specificity of this biosensor showed a suitable method to detect specific molecular binding events.

Further, the durability and stability of AFM tips with bonded carbon nanotubes with encapsulated amorphous carbon was studied on a standard semiconductor sample with quantum dots in air and liquid environment. Two different CNT AFM-tips were studied within this study in acoustic mode. One was assembled in our group and the other tip was provided by the american CDI (Carbon Design Innovation) company. The topographic AFM images were analyzed via FT (Fourier Transform) to study the spatial resolution of these tips. In air, both types of CNT tips showed a minor resolution decrease of approximately 6% after 400 topographic scans. In liquid environment an overall 10% lower spatial resolution of the tips was observed compared to the resolution in air which nevertheless makes these CNT AFM-tips suitable for experiments with native biological samples.

Índice

Capítulo 1	<i>Introdução</i>	1
1.1	– Introdução	1
1.2	– <i>Xylella fastidiosa</i>	4
1.3	– <i>Citrus Tristeza Virus</i>	6
1.4	– Apresentação da Tese	7
1.5	– Referências	8
Capítulo 2	<i>Técnicas Experimentais</i>	10
2.1	– Técnicas de Microscopia por Varredura com Ponta de Prova	10
2.2	– Microscopia por Força Atômica (AFM)	11
2.3	– Modo Contato (CM-AFM)	12
2.4	– Modo Não-Contato (NC-AFM)	13
2.5	– Espectroscopia de Força Atômica	15
2.6	– Referências	17
Capítulo 3	<i>Leis de Escala na Formação de Biofilmes</i>	18
3.1	– Introdução	18
3.2	– Metodologia	20
3.3	– Resultados e Análise	23
3.4	– Conclusão Parcial	30
3.5	– Referências	30

Capítulo 4	<i>Espectroscopia de Força</i>	32
4.1	– Introdução	32
4.2	– Funcionalização de Superfícies Semicondutoras	33
4.3	– Imobilização de antígenos e anticorpos em superfícies semicondutoras	39
4.4	– Funcionalização e imobilização de anticorpos em pontas de AFM	45
4.5	– Espectroscopia de força: interação antígeno-anticorpo	47
4.6	– Imagens Topográficas do CTV	53
4.7	– Conclusão Parcial	55
4.8	– Referências	56
Capítulo 5	<i>Biossensores em semicondutores de InP</i>	57
5.1	– Introdução	57
5.2	– Metodologia	59
5.3	– Resultados e Análise	61
5.4	– Conclusão Parcial	67
5.5	– Referências	68
Capítulo 6	<i>Pontas de AFM com nanotubos de carbono (CNT)</i>	69
6.1	– Introdução	69
6.2	– Metodologia	72
6.3	– Resultados e Análise	74
6.4	– Durabilidade das Pontas com CNT	76
6.5	– Medidas em meio líquido	81
6.6	– Conclusão Parcial	83
6.7	– Referências	84
Capítulo 7	<i>Conclusões Gerais</i>	85
	Referências	87
Apêndice A	<i>Calibração da constante de mola das alavancas</i>	88
	Referências	89
Lista de publicações		90

Lista de Abreviações:

α	Expoente de rugosidade
ξ	Comprimento de Correlação
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
APTES	<i>3-AminoPropylTrietoxy-Silano</i>
CAS	Caseína
CM-AFM	<i>Contact Mode - Atomic Force Microscopy</i>
CNT	<i>Carbon Nanotube</i>
CTV	<i>Citrus Tristeza Virus</i>
D_f	Dimensão Fractal
D.O.	Densidade Óptica
DLA	<i>Diffusion Limited Aggregation</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPS	Exo-polissacarídeo
FET	<i>Field Effect Transistor</i>
FT	<i>Fourier Transform</i>
InP	Fosfeto de Índio
NC-AFM	<i>Non-Contact - Atomic Force Microscopy</i>
RLA	<i>Reaction Limited Aggregation</i>
SiN_x	Nitreto de Silício
SPM	<i>Scanning Probe microscopy</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PZT	<i>Piezoelectric</i>

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1 Introdução

A descoberta do microscópio óptico no final do século 17 causou uma revolução na biologia revelando o que anteriormente era invisível e desvendando um mundo antes desconhecido ^[01]. A junção da física e matemática com as ciências biológicas pode ser comparada com esta revolução. Nas últimas décadas, esta junção multidisciplinar tem sido enriquecedora para todas as áreas ^[01,02,03]. A biologia está estimulando a criação de novos campos da física/matemática que nos mostram características anteriormente “invisíveis” dentro da biologia, como por exemplo crescimentos que obedecem leis de escala e emergem obedecendo níveis de organização através da interação de unidades biológicas heterogêneas, dependendo de sua escala temporal e da sua dimensão física. Desta forma é possível estudar a formação fractal formada pelo crescimento de ramos de uma árvore, ou em escalas micrométricas, o crescimento de uma colônia de fungos ou bactérias, obtendo informações quantitativas de um sistema estocástico ^[02,04].

Para estes últimos, o Microscópio de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) é amplamente utilizado para obter informações (topográfica, elétrica, magnética, etc) sobre a amostra sendo analisada. Devido a sua versatilidade e possibilidade de aplicação em uma grande gama de materiais, o AFM mostrou-se também ferramenta importante para o estudo de biomateriais, especialmente porque as

medidas podem ser realizadas em líquido, muitas vezes simulando mais adequadamente o ambiente onde este material será utilizado ^[05]. O AFM analisa essencialmente superfícies e sistemas vivos apresentam uma enorme variedade de superfícies, especialmente membranas. Deste modo, alguns autores afirmam que o uso do AFM em materiais biológicos está introduzindo uma nova área de pesquisa, a biologia de superfície ^[06]. Dentro deste contexto, tem aumentado o uso de AFM para estudos da formação de biofilme de microrganismos, uma vez que, quando em biofilme a população bacteriana torna-se mais virulenta e resistente a vários compostos antimicrobianos ^[07-10], conforme será comentado mais adiante.

A habilidade do AFM de adquirir imagens em condições ambientes ou em solução foi considerada ideal para estudos de espécimes biológicos em condições fisiológicas. Com isso, processos induzidos por infecção viral em células vivas ^[11] puderam ser observados. Mais recentemente, imagens AFM de alta resolução foram obtidas, por exemplo, em proteínas da membrana de bactérias ^[12]. A análise AFM de cristais 2D de proteínas de membrana foi desenvolvida ao ponto da energia livre poder ser modelada para domínios dentro de uma única molécula da proteína. Na aplicação em células vivas, o instrumento revelou novas estruturas celulares e suas funções ^[13].

A resolução deste microscópio depende diretamente da dimensão da sonda de varredura, geralmente de Si ou SiN_x, que é da ordem de nm. Nanotubos de carbono (CNTs) acoplados à esta ponta tem mostrado grande resistência ao desgaste além de possuir grande flexibilidade e grande razão de aspecto com dimensões nanométricas ^[14]. Estes CNTs podem ser encapsulados com uma capa de carbono, que promovem maior estabilidade térmica e melhor controle de seu comprimento em processos de fabricação ^[14]. A aplicação desta ponta com CNT em materiais biológicos, porém, exige muitas vezes que este seja utilizado em meio líquido.

O AFM também é uma técnica que possibilita estudar interações tanto inter como intra-moleculares de macromoléculas sintéticas e biológicas complexas com alto grau de precisão espacial (~nm) e resolução de força (~pN), respectivamente ^[15,16]. Esta medida é mais comumente denominada espectroscopia de força, pois permite sondar interações moleculares. Nos experimentos realizados com o AFM, um dos elementos é ligado covalentemente à ponta de AFM enquanto o outro é ligado a uma superfície. A

ponta do AFM é colocada em contato com esta superfície e uma ligação específica entre as duas moléculas pode se formar. Na retração, esta ligação sofre uma carga que aumenta até sua ruptura. Tanto o tensionamento do espaçador polimérico quanto a ruptura do complexo molecular são registrados através da deflexão da alavanca do AFM^[17,32].

Ligações biomoleculares entre grandes macromoléculas resultam de uma associação de várias interações fracas que, combinadas, formam um agregado estável. No caso mais simples de uma ligação isolada, esta se dissociará sob força zero num intervalo de tempo maior que seu tempo de vida. Este tempo pode ser abreviado pela aplicação de forças externas. Este conceito foi descrito primeiramente por Bell em 1978^[18], que mostrou que a falha da ligação é um processo estatístico e que o tempo de vida de uma ligação depende da carga mecânica. Este conceito foi aprimorado por vários outros trabalhos subsequentes^[19,20,21] e encontrou suporte em dados experimentais^[22,23,24], que tornaram mais difundida a utilização da espectroscopia de força.

Por outro lado, ligações antígeno-anticorpo – como as que podem ser investigadas por espectroscopia de força – podem ser usadas como base da construção de sensores biológicos. Num sensor tipo FET (*Field Effect Transistor*), por exemplo, o óxido da porta é modificado com receptores moleculares; uma vez realizada a ligação de interesse com uma espécie carregada eletricamente, ocorre a depleção ou acúmulo de portadores na estrutura do transistor. Assim, o monitoramento da condutância (ou resistência, dada uma região linear da curva corrente-tensão do transistor) poderá ser interpretado como uma medida do número de ligações realizadas. Um desenvolvimento mais recente nessa área é a fabricação de nanosensores, cuja prova de conceito foi mostrada por Charles Lieber e seu grupo^[25].

Nesta tese estudamos dois sistemas biológicos, um biofilme formado pelo bacilo da *Xylella fastidiosa* e o vírus CTV (*Citrus Tristeza Virus* - vírus da tristeza do citros). A importância destes sistemas tanto em aspectos de pesquisa, quanto econômicos serão apresentados nos dois tópicos a seguir.

1.2 *Xylella fastidiosa*

Muitas espécies de bactérias podem viver tanto em vida livre quanto parasitando um hospedeiro; portanto estas devem ser capazes de se adaptar a mudanças súbitas de disponibilidade de nutrientes e a sistemas de defesa do hospedeiro. Um mecanismo de adaptação das bactérias neste sentido é sua capacidade de crescer como parte de um biofilme – uma comunidade fixa (colônia), encapsulada por uma matriz polimérica. O interesse científico no processo de formação de biofilmes aumentou muito nos últimos anos; estudos de genética molecular da formação de biofilmes começaram a apontar as causas para este processo. Hoje se reconhece que a formação de biofilmes é um aspecto importante de muitas doenças bacterianas ^[26]. Biofilmes podem tolerar agentes antimicrobianos em concentrações 10-1000 vezes maiores que as necessárias para matar bactérias planctônicas (bactérias individuais que vivem soltas no meio) geneticamente equivalentes, tornando-os muito difíceis de serem erradicados em hospedeiros vivos ^[26].

Bactérias em colônias que formam biofilmes podem suportar diminuição de nutrientes, mudanças no pH, antibióticos, etc, bem melhor que organismos planctônicos. A ‘invulnerabilidade’ do biofilme depende de características tais como a baixa taxa de crescimento e a heterogeneidade fisiológica de seus habitantes, além da matriz de exo-polímeros (predominantemente exo-polissacarídeos, ou EPS) que as envolve. O EPS tem um papel importante nos estágios iniciais e finais do biofilme ^[26,27,28], proporcionando a agregação e eventualmente a sua estrutura final. A matriz de EPS pode também estar envolvida na tolerância a agentes antimicrobianos ^[27].

A formação de biofilme é composta por diferentes estádios iniciando-se pela adesão na superfície, proliferação bacteriana dentro de microcolônias e expansão, formando estruturas altamente organizadas. Sauer ^[26] dividiu a formação de biofilme em cinco estádios diferentes. O estágio 1, correspondente a adesão reversível das células na superfície; o estágio 2 é referente à adesão irreversível mediada principalmente pela produção de substâncias exopoliméricas; no estágio 3 inicia-se a primeira fase de maturação do biofilme caracterizada pelo início do desenvolvimento de sua arquitetura;

a segunda fase de maturação, estágio 4, corresponde ao biofilme totalmente maduro, com alta densidade celular, e arquitetura de forma complexa; o estágio 5 é referente à fase de dispersão das células do biofilme (Figura 1.1).

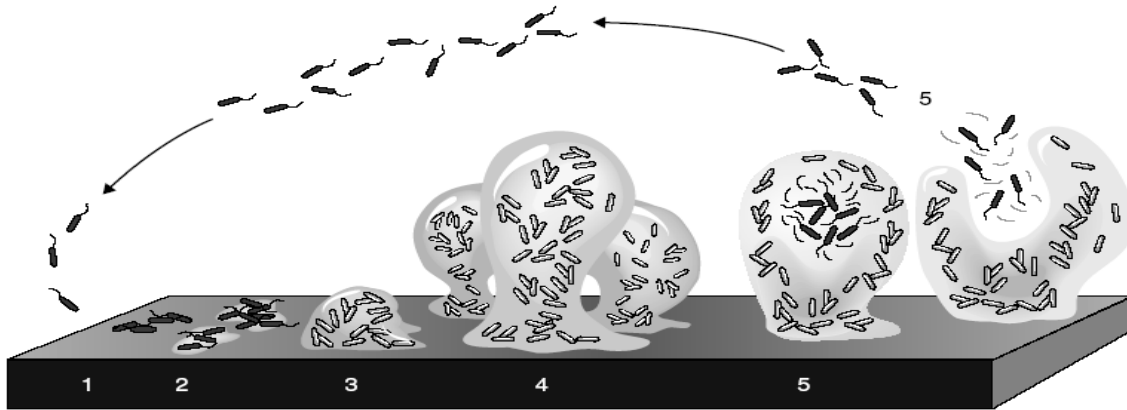


Figura 1.1: Modelo dos estádios de desenvolvimento de biofilme bacteriano ^[29].

Várias questões permanecem em aberto sobre a formação de biofilmes, inclusive seus mecanismos de controle. A maior parte dos estudos sobre formação de biofilmes é em patógenos de humanos e animais; muito pouco se sabe sobre a formação de biofilmes de bactérias patógenas de plantas. Essa lacuna é ainda mais relevante quando se considera que a planta não possui sistema imunológico, limitando os tipos de tratamento disponíveis para plantas infectadas.

Existe um tipo de fitobactéria chamada *Xylella fastidiosa* que forma biofilmes e tem grande impacto na agricultura mundial. No Brasil tem sido encontrada em várias plantas, porém as culturas de importância econômica mais afetadas são ameixeira, cafeeiro e citros. Estas bactérias se instalam no xilema das plantas (vasos de condução de seiva), provocando o estresse hídrico. Além deste fator, a produção de fitotoxinas e alterações na concentrações de reguladores de crescimento contribuem com o secamento dos frutos e a necrose das folhas, levando por vezes a planta à morte^[33].

Esta doença é conhecida como clorose variegada do citros (CVC, ou popularmente “doença do amarelinho”), que provoca perdas anuais de aproximadamente US\$100 milhões para a agro-indústria do citros. Por esta razão, a *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno com genoma completo sequenciado, atividade realizada por consórcio de pesquisadores brasileiros ^[26]. Foi demonstrado que o fato desta bactéria formar um biofilme pode ser um fator importante para sua patogenicidade^[26].

1.3 *Citrus Tristeza Virus* (vírus da tristeza do citros - CTV)

A tristeza dos citros é considerada uma das doenças virais de maior importância econômica na citricultura mundial. Através de técnicas de microscopia eletrônica, foi possível observar que é causada por partículas virais longas e flexíveis, com 10 a 12 nm de diâmetro por 2 μ m de comprimento ^[30]. Dentre os vários sintomas destaca-se desde um leve clareamento das nervuras a severas caneluras (rachaduras) do tronco, acompanhadas de um rápido declínio no crescimento e necrose do floema (tecido vasculares encarregado pelo transporte da seiva elaborada pela planta).

Na década de 40, o CTV foi responsável pelo quase aniquilamento da citricultura brasileira - um dos maiores produtores mundiais - e atualmente o Brasil tem convivido com essa doença a partir da descoberta de clones de laranjeiras que são pré-imunizadas contra o vírus e por isso mais tolerantes ^[31], tanto que hoje todas as plantas encontram-se em maior ou menor grau afetadas por esta virose. Assim, a importância do CTV como um dos fatores que contribuem para a redução da produtividade dos pomares em nosso país é amplamente reconhecida pela comunidade científica e empresarial e a detecção do grau de infecção da planta é de fundamental importância para esta área.

1.4 Apresentação da tese

Neste projeto, temos como objetivo acoplar o conhecimento do nosso grupo em microscopia, crescimento de superfícies e semicondutores para explorar vários aspectos de fitopatógenos relacionados a citricultura, aproveitando o espectro relativamente amplo de dados já existentes nessa área economicamente importante, e reforçando colaborações que mantivemos nos últimos anos com pesquisadores da biologia e da química.

Esta tese foi dividida em mais 6 capítulos. O capítulo 2 fará um breve apanhado das principais técnicas experimentais utilizadas ao longo deste projeto, descrevendo principalmente a técnica de microscopia de força atômica e suas variantes, inclusive a espectroscopia de força.

Os capítulos de 3 a 6 apresentam os resultados desta tese, sendo que todos obedecem a mesma estrutura: uma introdução que apresentará também aspectos teóricos para a interpretação dos dados; uma metodologia que apresenta todos os aspectos experimentais das medidas; os resultados e análise dos dados; e por fim uma conclusão parcial.

Seguindo a sequência, serão apresentados: o estudo na organização de bactérias em biofilmes (cap. 3); espectroscopia de força em interações antígeno-anticorpo (cap. 4); o desenvolvimento de biossensores em substratos semicondutores planos (cap. 5); e sondas de AFM com CNTs encapsulados, resistência e medidas em líquido (cap. 6).

Por fim, serão apresentadas as conclusões gerais (cap. 7), correlacionando todos os resultados desta tese. As perspectivas deste trabalho também serão apresentadas juntamente com sugestões para que este possa ser aperfeiçoado.

1.5 Referências

- [01] Cohen, J.E.; J. Plos Biology; V2 Issue 12 e439 (2004).
- [02] Barabási, A.L.; Stanley, H.E.; Fractal Concepts in Surface Growth, Cambridge University Press (1995).
- [03] Murray, J.D.; Mathematical Biology: I. An Introduction; Springer (2000).
- [04] Wakita, J.; Komatsu, K.; Nakahara, A.; Matsuyama T.; Matsushita, M.; Journal of the Physical Society of Japan, 63, 1205-1211, (1994).
- [05] Hörber, J.K.H.; Miles, M.J.; Science 302, 1002 (2003).
- [06] Hansma, H.G.; Annu.Rev.Phys.Chem. 52, 71 (2001).
- [07] Rozatos et al., 1998; Auerbach et al., 2000; Mah & O'Toole, (2001).
- [08] Auerbach, I.D.; Sorensen, C.; Hansma, H.G.; Holden, P.A.; J Bacteriol. 182(13):3809-15 (2000).
- [09] Razatos, A.; Ong, Y.L.; Sharma, M.M.; Georgiou, G.; Proc Natl Acad Sci U S A. 95(19):11059-64 (1998).
- [10] Mah, T.F.; O'Toole, G.A.; Trends Microbiol. 9(1):34-9. Review. (2001).
- [11] Häberle, W.; Höber, J.K.H.; Ohnesorge, F.; Smith, D.P.E.; Binnig, G.; Ultramicroscopy 42-44, 1161 (1992).
- [12] Scheuring, S.; Miller, D.J.; Stahlberg, H.; Engel, H.A.; Engel, A.; Eur.Biophys.J. 31, 172 (2002).
- [13] Jeremic, A.; Kelly, M.; Cho, S.J.; Stromer, M.H.; Jena, B.P.; Biophys.J. 85, 2035 (2003).
- [14] Nakabayashi, D.; Moreau, A. L. D.; Coluci, V. R.; Galvão, D. S.; Cotta, M. A.; Ugarte, D.; Nano Lett.; 8:3, (2008).
- [15] Florin, E.L.; Moy, V.T.; Gaub, H.E. ; Science 264, 415 (1994).
- [16] Viani, M.B.; Schäffer, T.E.; Chand, A. ; Rief, M. ; Gaub, H.E. ; Hansma, P.K. ; J.Appl.Phys. 86, 2258 (1999).
- [17] Dufrêne, Y. F.; Hinterdorfer, P.; Pflugers Arch - Eur J Physiol 256:237–245 (2008).

- [18] Bell, G.I. ; Science 200, 618 (1978).
- [19] Evans, E.; Berk, D.; Leung, A.; Biophys.J. 59, 838 (1991).
- [20] Evans, E.; Ritchie, K.; Biophys.J. 72, 1541 (1997).
- [21] Grubmüller, H.; Heymann, B.; Tavan, P.; Science 271, 997 (1996).
- [22] Rief, M.; Oesterhelt, F.; Heymann, B.; Gaub, H.E.; Science 275, 1295 (1997).
- [23] Dammer, U.; Hegner, M.; Anselmetti, D.; Wagner, P.; Dreier, D.; Huber W.; Güntherodt, H.J.; Biophys.J. 70, 2437 (1996).
- [24] Krüger, D.; Fuchs, H.; Rousseau, R.; Marx, D.; Parrinello, M. ; Phys.Rev.Lett. 89, 186402 (2002).
- [25] Cui, Y.; Wei, Q.; Park, H.; Lieber, C.M.; Science 293, 1289 (2001).
- [26] Donlan, R.M.; Costerton, J.W.; Clin. Microbiol. Rev. 15, 167 (2002).
- [27] Lewis, K.; Antimicrob. Agents Chemother. 45, 999 (2001).
- [28] O'Toole, G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R.; Annu. Rev. Microbiol. 54, 49 (2000).
- [29] Selhuber, C.; Blummel, J.; Czerwinski, F.; Spatz, J.P.; Nano Lett. 6, 267 (2006).
- [30] Tlili, A.; Jarbouib, M.A.; Abdelghania, A.; Fathallahb, D.M.; Maaref, M.A.; Materials Science and Engineering; C 25, 490 – 495 (2005).
- [31] Garnsey, S.M.; Gonsalves D.; Purcifull D.E.; Phytopathology, 67, 8, 965-968 (1977).
- [32] Lieber, C.M.; Chemical Force Microscopy; Annu Ver. Mater. Sci.; 27:381 (1997).
- [33] Chen, J.; Lamikanra, O.; Chang, C.J.; Hopkins, D.L.; Appl. Environ, Microbiol.; 1688-1690; (1995).

Capítulo 2

Técnicas Experimentais

2.1 Técnicas de Microscopia por Varredura com Ponta de Prova (SPM)

A microscopia por varredura consiste em realizar medidas sequenciais de alguma grandeza física sobre diversos pontos de uma determinada área, com o objetivo final de formar uma imagem de sua morfologia unindo todos os pontos adquiridos. Na microscopia por varredura com ponta de prova, a análise da amostra é realizada com o auxílio da contração ou expansão mecânica de cerâmicas *piezo-elétricas* que compensam as variações de topografia detectadas por uma ponta de dimensões nanométricas. Quando estão em forma de tubos, as cerâmicas *piezo-elétricas* podem efetuar movimentos tridimensionais quando aplicamos potenciais elétricos através de eletrodos conectados no tubo. Dependendo do tamanho deste, as áreas varridas podem chegar até $\sim 150\mu\text{m}$ de lado e a resolução pode ser sub-atômica. Este sistema de movimentação chamado de *scanner* pode ser instalado tanto na ponta quanto na amostra. Para a aquisição de propriedades físicas de superfícies ou sub-superfícies são utilizadas pontas com características particulares para cada necessidade envolvida. A ponta ideal para aquisição de topografias possui razão de aspecto (comprimento/largura) alta, enquanto que para medidas de condutância é interessante que a ponta possua a maior condutividade possível. Entretanto, essas condições dificilmente são encontradas e pontas com razão de aspecto não ideal podem gerar imagens que não correspondem ao perfil real da amostra. Com a convolução

resultante, as estruturas medidas pela ponta não ideal podem ter seu tamanho aumentado (no caso de ilhas) ou diminuído (no caso de depressões).

2.2 Microscopia por Força Atômica (AFM)

Esta microscopia consiste em analisar a superfície de uma amostra com uma ponta de prova. A ponta é montada sobre uma alavanca com constante de mola conhecida. Quando a ponta está próxima da superfície da amostra, forças de interação defletem a alavanca. Esta deflexão é medida por um sistema de detecção de posição; o sinal de erro gerado é enviado para o circuito de realimentação do microscópio. A distância ponta-amostra é então ajustada pela mudança na posição de um *scanner* piezoelétrico, de modo a manter constante a força medida pela alavanca. Estas variações de posição são calibradas com padrões de altura; deste modo, o mapa destas variações nos fornece a topografia da superfície. A gama de amostras que podem ser analisadas com AFM é muito ampla, na qual podemos destacar: amostras isolantes, materiais biológicos *in vitro*, medidas *in situ* no modo eletroquímico, etc.

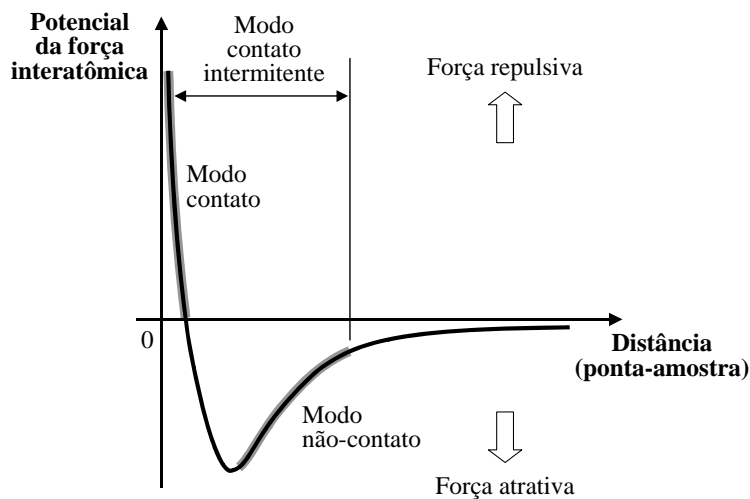


Figura 2.1: Comportamento qualitativo da dependência do potencial da força interatômica com a distância entre a ponta de prova e a superfície da amostra. Dependendo do regime de forças escolhido existem três modos de operação: contato, não-contato e contato-intermitente. No contato-intermitente a ponta de prova trabalha intercalando entre potenciais de forças atrativas e repulsivas^[01]. Este último não será tratado nesta tese.

A deflexão da alavanca pode ser causada por muitas forças de interação entre a ponta e a superfície da amostra, sendo um problema bastante complicado do ponto de vista teórico. Os modelos mais simples utilizados consideram a força devido ao potencial de Lennard-Jones ^[01,02]. Na Figura 2.1 temos a dependência qualitativa do potencial da força interatômica com a distância entre a ponta e a amostra. Dependendo do regime de forças escolhido, existem três modos de operação para a microscopia por força atômica. No modo contato a força entre ponta-amostra é repulsiva, no modo não-contato o regime é de forças atrativas e no modo contato-intermitente ocorre uma inversão no tempo entre forças atrativas e repulsivas. A seguir apresentaremos somente os detalhes dos dois primeiros modos, operando em ar, destacando suas vantagens e desvantagens.

2.3 Modo Contato (CM-AFM)

Neste modo de operação, a ponta do AFM exerce um *contato físico* com a superfície da amostra. A intensidade da força envolvida é suficientemente baixa para que não ocorram deformações permanentes numa amostra rígida (um cristal semicondutor, por exemplo) ou na ponta, impedindo a reprodutibilidade e prejudicando a qualidade dos resultados. Em ambientes expostos ao ar existe, frequentemente, uma fina camada adsorvida (água, por exemplo) ^[02] sobre a superfície da amostra, que adiciona a força de capilaridade ao problema. A intensidade da força de capilaridade depende da distância entre a ponta e a amostra, mas em geral é da ordem de 10nN. Em ar e com forças repulsivas da ordem de 10nN, a ponta do AFM não penetra na fina camada de água sobre a superfície, mas no intervalo típico de operação do modo contato de 0,1 até 1μN a ponta exerce o *contato físico* com a superfície da amostra, depois de “perfurar” esta camada de água. Esta última pode ser eliminada caso o meio de medida seja de um gás inerte seco, como N₂ por exemplo.

A detecção da deflexão da alavanca pode ser feita por vários métodos ^[01], sendo que os mais utilizados são os sistemas de deflexão óptica. Nos nossos microscópios de força atômica (modelos *Auto Probe CP* da *Park Scientific Instruments* / *ThermoMicroscopes* e posteriormente *Veeco*, e *Agilent 5500*), a medida da deflexão da

alavanca é realizada conforme mostra a Figura 2.2. Um feixe *laser* incide sobre a alavanca, na parte oposta onde está montada a ponta, e atinge um fotodetector sensível à posição (PSPD). Quando a alavanca sofre uma deflexão ocorre a mudança da posição do feixe *laser*, refletido pela alavanca, no fotodetector. Variações menores que 1Å podem ser obtidas dependendo do fator de amplificação do sistema ótico, que é proporcional à razão do caminho óptico entre a alavanca e o detector e o comprimento da alavanca. O sistema de movimentação tridimensional, *scanner* na Figura 2.2, permite que a amostra realize varreduras nas direções **x** e **y**. Durante estas varreduras, a topografia da amostra é medida adquirindo as variações **z** (direção vertical) do *scanner*, produzidas pelo sistema de realimentação para manter a força constante, conforme mostra a figura 2.2. Imagens topográficas de alta resolução são adquiridas mantendo fixa a posição vertical (modo altura constante) do *scanner* e medindo somente as deflexões da alavanca, para o caso de superfícies atômicamente planas.

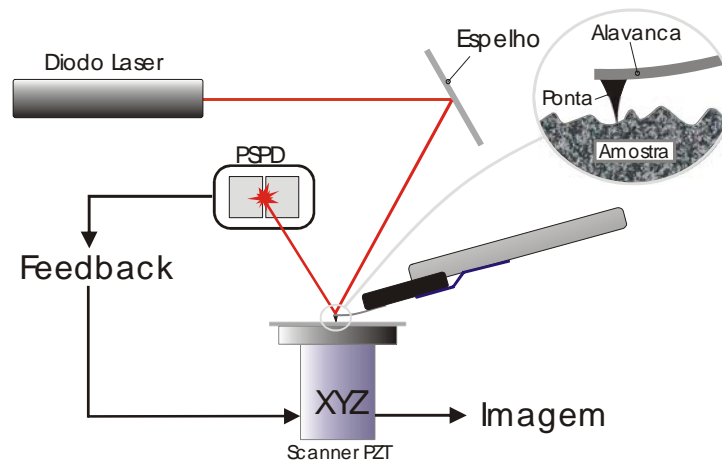


Figura 2.2: Esquema geral da montagem e funcionamento da microscopia por força atômica em modo contato. O feixe *laser* incide sobre a alavanca; sua reflexão é detectada por um fotodetector sensível à posição (PSPD), o que permite medir a deflexão da alavanca devido às forças de interação entre ponta-amostra.

2.4 Modo Não-Contato (NC-AFM)

O regime de forças atrativas do modo não-contato, que geralmente apresentam forças em torno de 0,01nN^[01], pode ser visto na Figura 2.1. Em modo não-contato, um oscilador bimorfo (um piezoelétrica colado com uma camada metálica) faz a alavanca

vibrar numa frequência (f_o^+) um pouco maior que uma de suas frequências de ressonância, f_o (tipicamente de 50 até 400kHz – em todos os casos, muito maior que a frequência de realimentação da topografia, $< 5\text{kHz}$), com uma amplitude de dezenas de nanômetros. A amplitude do sinal medido pelo fotodetector, na frequência selecionada, é enviada ao sistema de realimentação do microscópio, conforme vemos na Figura 2.3. Na presença do gradiente de força na região próxima à superfície da amostra, a nova frequência de ressonância f_o' é menor que f_o ^[01] e, portanto, ocorre diminuição na amplitude de vibração da alavanca. O sistema de realimentação trabalha mantendo fixa uma certa diminuição nessa amplitude e com isso a distância (média) entre ponta-amostra é mantida constante. A camada adsorvida de água sobre as amostras analisadas em ar ^[02], não é “perfurada” nesse modo de operação do AFM, pois a força envolvida é muito menor que a necessária para tal. Caso a espessura desta camada não seja homogênea sobre toda a área varrida, a imagem topográfica não irá corresponder à superfície real da amostra. Contudo, por apresentar pequenas forças de interação ($<< \text{nN}$), que diminuem a pressão na superfície analisada, este modo é bastante utilizado em amostras com superfície muito macias, viabilizando sua utilização no ramo da biologia.

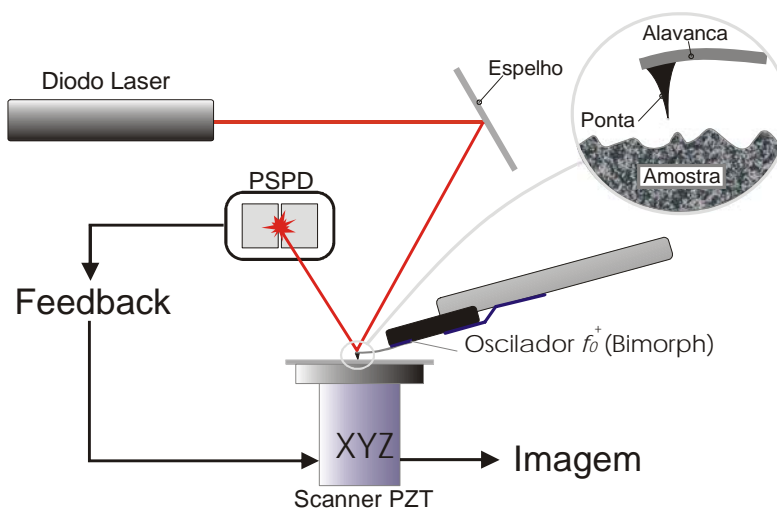


Figura 2.3: Esquema geral da montagem e funcionamento da microscopia por força atômica em modo não contato. Variações na amplitude da oscilação da alavanca permitem que sejam adquiridas imagens topográficas com forças repulsivas da ordem de $0,01 \text{ nN}$ ^[01].

2.5 Espectroscopia de Força Atômica

O microscópio de força atômica é muito útil para medição de forças intermoleculares pois tem resolução de força da ordem de piconewton e resolução espacial da ordem de nanômetros. A resolução de força do AFM é várias ordens de grandeza maior que a mais fraca ligação química. Isto sugere que é possível medir interações moleculares individuais. A funcionalização da ponta do AFM com, por exemplo, monocamadas orgânicas (ligações covalentes) que tem terminações em grupos funcionais bem definidos, permite a identificação de grupos moleculares. Esta aplicação do AFM é chamada na literatura de Espectroscopia de Força Atômica (AFS – *Atomic Force Spectroscopy*)^[03,04].

Mesmo sendo possível medir interações químicas individuais, devido ao raio de curvatura da ponta, um grupo químico específico da ponta interagindo com a superfície da amostra não terá interações moleculares completamente definidas ocasionando a dispersão dos resultados. Por isso é necessária uma grande quantidade de medidas para obter uma boa estatística da força de interação.

Utilizando pontas quimicamente funcionalizadas, o microscópio de força atômica pode ser utilizado para medir forças entre diferentes grupos moleculares.

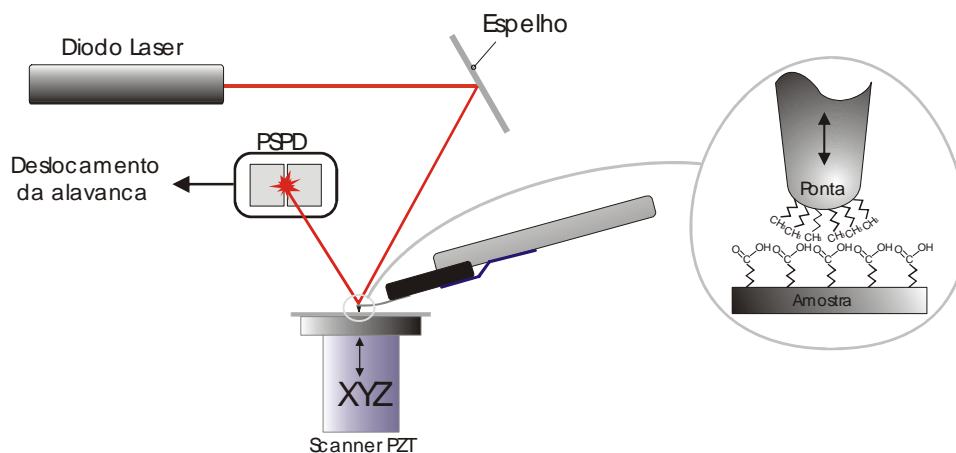


Figura 2.4: Desenho esquemático do funcionamento de um AFS. A amostra é fixada em um *scanner* piezoelétrico que se desloca em z. Um feixe laser reflete na alavanca e depois chega a um fotodetector no qual será detectado o movimento em z da alavanca. Quando a amostra se aproxima e encosta na ponta, haverá uma deflexão da alavanca que irá movimentar o laser e ser detectado pelo fotodetector. No destaque temos a interação entre uma ponta e uma amostra funcionalizados com tiol com terminação em CH_3 e COOH respectivamente.

Em princípio o AFM pode medir tanto interações moleculares fracas, como a força de van der Waals ($\sim > \text{pN}$), quanto ligações covalentes fortes ($\sim 0,1 \mu\text{N}$)^[03]. Na prática temos que a resolução da força é limitada pelos ruídos eletrônicos do sistema óptico do microscópio e pela excitação térmica da vibração da alavanca.

A magnitude das interações intermoleculares pode ser obtida diretamente por medição de força de adesão (Figura 2.5). A interação adesiva entre diferentes grupos funcionais é determinada pela curva de força versus distância da ponta da amostra. Durante a medição, a deflexão da alavanca é monitorada durante o ciclo de aproximação e afastamento da amostra em relação à ponta. Conhecendo a constante de mola da alavanca, é possível calcular esta força, conforme será descrito no capítulo 4. O salto no valor da força causado quando a alavanca é liberada da amostra, corresponde à força de adesão entre os grupos funcionais da ponta e os da superfície da amostra.

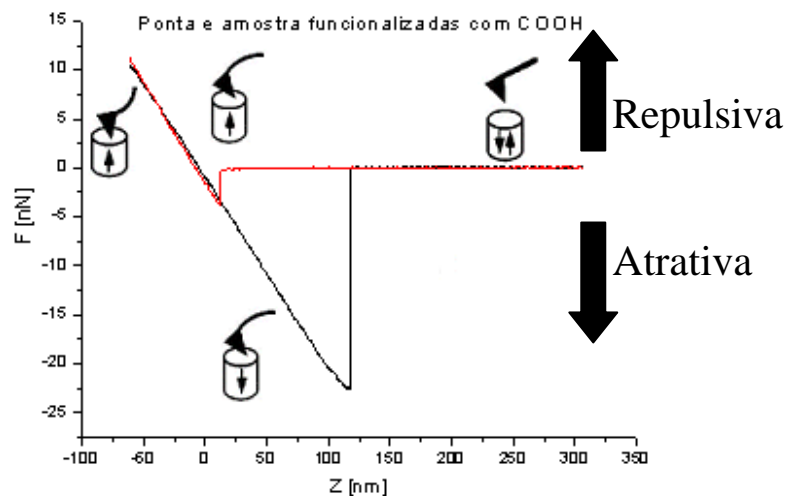


Figura 2.5: Curva da força pela distância da amostra, onde a curva vermelha indica a aproximação enquanto a preta o afastamento da ponta/amostra. Em grandes distâncias, não são observadas forças entre a alavanca e a amostra. A uma pequena distância, a ponta é atraída abruptamente para a amostra devido às forças de van der Waals; subsequentemente a alavanca acompanha o movimento linear da amostra. Existe uma pequena histerese na ida e na volta da alavanca quando ela está no regime linear. É necessária uma força finita para soltar a ponta da amostra; esta força corresponde à força de adesão dos grupos funcionais da ponta e da amostra^[05].

2.6 Referências

- [01] Sarid, D.; *Scanning Force Microscopy; With Application to Electric, Magnetic, and Atomic Forces* (Oxford Series on Optical Sciences, Oxford University Press, Oxford, 1991).
- [02] Zangwill, A.; *Physics at Surfaces* (Cambridge Univ. Press, 1988).
- [03] Lieber, C.M.; *Chemical Force Microscopy; Annu Ver. Mater. Sci.*; 27:381 (1997).
- [04] Tormoen, G.W; Drelich, J.; *J. Adhesion Sci. Technol.*, 18 (1):1–17 (2004).
- [05] Moreau, A.L.D.; “*Processamento e Funcionalização de Pontas Para Aplicações Biológicas de Microscopia de Força Atômica*”; Tese de Mestrado apresentada no Instituto de Física Gleb Wataghin da Unicamp (2003).

Capítulo 3

Leis de Escala na Formação de Biofilmes de *Xylella fastidiosa*

3.1 Introdução

O estudo de leis de escala no crescimento de superfícies é uma importante ferramenta para determinar os mecanismos que governam a evolução morfológica de uma superfície. O comportamento de escala e os expoentes críticos (ou dimensão fractal) observados experimentalmente são frequentemente comparados com modelos de agregação tais como o de Eden, RLA (*Reaction-Limited Aggregation*) e o DLA (*Diffusion-Limited Aggregation*)^[01].

Em particular, a superfície da colônia de bactérias pode também ser entendida como uma superfície em crescimento. Foram feitas simulações computacionais para estudar o crescimento de colônias de bactérias e fungos tendo como fator de *stress* a difusão de nutrientes^[02,03]. O cálculo da dimensão fractal para estes casos se adequam com os modelos de crescimento estatístico de Eden e DLA, que por sua vez foram verificados experimentalmente no crescimento de uma colônia de fungos^[04].

Assumindo que o crescimento do sistema se dá pela adesão de partículas formando um *cluster*, o modelo de Eden assume que este último possui uma forma compacta, crescendo com a adição de uma nova partícula (um fungo ou uma bactéria

formada por divisão celular, por exemplo) aleatoriamente em qualquer sítio da superfície do *cluster*, sem qualquer tipo de barreira ou limite para esta agregação (figura 3.1-A) ^[05]. Por outro lado, o modelo de agregação DLA ocorre em qualquer meio onde a difusão de partículas é o principal meio de transporte; ou seja, um *cluster* formado através da agregação de partículas submetidas a um movimento Browniano (figura 3.1-B). Para este modelo, é possível que forme um gradiente de nutrientes local aumentando as chances da partícula agregar a regiões mais externas do *cluster*, o que pode causar a formação de ramos devido a efeitos chamados de sombra ou blindagem, conforme é observado na figura ^[02, 04, 06].

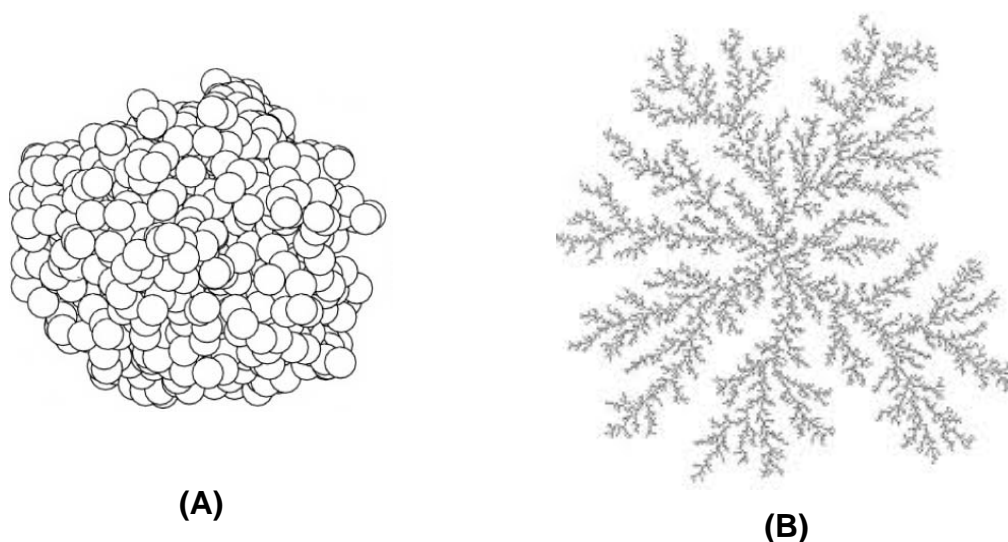


Figura 3.1: (A) *Cluster* formado pelo modelo de Eden. (B) *Cluster* formado pelo modelo DLA^[01]

Alguns tipos de colônias de bactérias podem formar um tipo de cápsula em sua volta chamada de biofilme. Isto ocorre através da secreção de uma matriz polissacarídica protetora que adere em torno da colônia, feita essencialmente de EPS (*Exo-polissacarídeos*). Este tipo de estrutura traz diversas vantagens para o sistema biológico, tais como a maior resistência a antibióticos e comunicação facilitada entre as células através de moléculas sinalizadoras, processo conhecido como *quorum sensing*. Dentro destas matrizes existem canais que ajudam na distribuição de nutrientes e moléculas sinalizadoras ^[07, 08].

Neste capítulo descreveremos o estudo do processo de crescimento de um biofilme de *Xylella fastidiosa* (*X. fastidiosa*) desde a sua inoculação até seu estágio final de 30 dias. A bactéria foi inoculada na superfície de vidro, sem a reposição de nutrientes (uma prática comum para o estudo do crescimento de um biofilme^[08], que possibilita o acompanhamento todo o seu ciclo de crescimento. Esta condição gera um fator de stress no biofilme). O tamanho e a distância entre biofilmes foram analisados por imagens de microscopia ótica e de força atômica; conceitos de escala dinâmica aplicados em superfícies em crescimento foram usados juntamente com imagens de AFM com o objetivo de caracterizar o processo de crescimento de uma colônia de bactérias que forma um biofilme. Esse estudo permitiu analisar a influência do EPS na forma em que as bactérias se organizam.

3.2 Metodologia

Os biofilmes de *X. fastidiosa* foram fornecidos pelo grupo da Dra. Alessandra Alves de Souza, do Centro APTA Citros - Sylvio Moreira, onde as células de *X. fastidiosa* foram inoculadas a 28°C numa lamínula de vidro com 12mm de diâmetro. Os biofilmes foram analisados em 5, 10, 15, 20 e 30 dias depois da inoculação, onde as amostras foram lavadas, secas e cobertas por *sputtering* com um filme de 50nm de Au.

A *X. fastidiosa* torna-se um biofilme completo após aproximadamente 10~15 dias de inoculação, quando é possível detectar a completa formação de EPS em torno do biofilme^[09]. Todavia, em nossas amostras, o EPS foi removido durante o processo de preparação para a metalização por uma camada de Au. Também é possível que alguns biofilmes tenham desgrudado do substrato durante o processo de preparação, porém todas as amostras passaram pelos mesmos processos, o que possibilita a análise comparativa.

A matriz polimérica de EPS forma uma superfície com aspecto gelatinoso, com grande variações de altura. Com exceção dos primeiros estádios de formação do biofilme (até ~ 1 dia), em que o EPS está ainda se formando, as medidas com AFM são praticamente inviáveis, e daí o motivo desta metalização e da remoção do EPS.

As amostras foram caracterizadas através de um microscópio ótico *Leitz-Ergolux* para a descrição do tamanho médio e a distância entre os biofilmes. Usamos o *software Image J* ^[10] para estimar o tamanho e as distâncias dos biofilmes. Para isto assumimos áreas circulares e mapeamos os seus diâmetros médios e a distância entre os seus centros. Para cada biofilme, as distâncias entre os 3 a 4 biofilmes mais próximos foram considerados para a média.

Medidas de AFM (Agilent 5500) foram feitas em ar em modo não contato; usamos pontas de Si com raio ~10nm e comprimento de 20μm (NSC14 AIBS - *μMash*), o que tornou possível as medidas das grandes variações de altura do biofilme. A figura 3.2 mostra um caso típico de uma imagem de AFM do biofilme de bactérias estudado. Esta imagem tem dimensão de 15 x 15μm, onde as cores representam a escala de altura do biofilme.

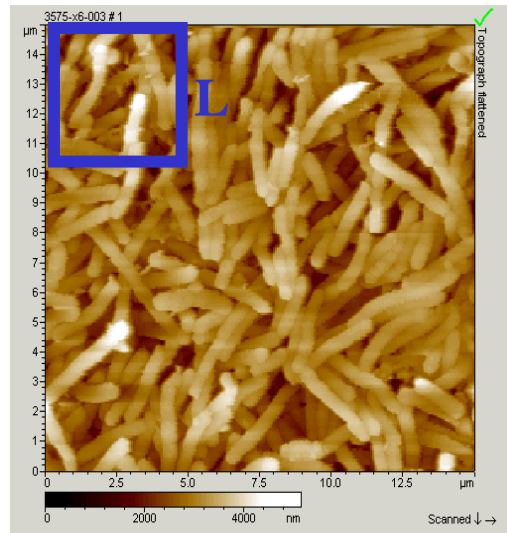


Figura 3.2: Ilustração da técnica *Box Counting* numa imagem de AFM. A rugosidade é calculada na área do quadrado azul, que por sua vez varre toda a superfície. Um ponto da curva rugosidade (w) em função de L é obtido pela média de todas as rugosidades desta varredura. O processo repete-se aumentando gradativamente o comprimento lateral L do quadrado, obtendo assim uma curva de $w(L)$.

As leis de escala foram estudadas através da rugosidade RMS da superfície da amostra, de acordo com a equação 3.1.

$$w(L, t) = \left\langle \left(h^2(\mathbf{x}, t) - \bar{h}^2 \right)^2 \right\rangle_{\mathbf{x}}^{1/2} \quad (3.1)$$

onde L e t representam o tamanho e o tempo de crescimento da amostra, respectivamente. Esta equação representa a média quadrática da flutuação da altura em torno de uma altura média.

Adquirimos imagens de AFM com tamanhos de 10x10, 20x20 e 30x30 μm^2 , próximos ao centro da amostra para evitar a superfície do substrato. A dependência da rugosidade com o tamanho da imagem foi estudada utilizando a técnica *Box Counting* ^[11], figura 3.2. Através desta última, utilizamos a teoria de escala dinâmica que diz que a rugosidade aumenta exponencialmente com o tamanho L da área analisada na imagem ^[01], ou seja

$$w(L) \sim L^\alpha \quad (3.2)$$

onde α é chamado de expoente de rugosidade e descreve o crescimento das correlações com o tamanho L ao longo da direção de crescimento. A função $w(L)$ aumenta com o tamanho L de acordo com a relação 3.2 enquanto as correlações continuarem a crescer. Caso a superfície possua características fractais, a rugosidade tenderá a entrar num regime de saturação, onde o comprimento L representará um tamanho ξ limite, denominado comprimento de correlação. O valor de ξ pode ser entendido como o comprimento no qual as flutuações estão correlacionadas, torna-se comparável ao comprimento L (máxima extensão que as correlações podem atingir ao longo da superfície). Para $L > \xi$, as correlações param de crescer e a superfície alcança um estado estacionário caracterizado por um valor constante de $w(L)$. Neste estado, a superfície é invariante sob transformação de escala e a rugosidade atinge uma saturação. A dimensão fractal – outro parâmetro que iremos utilizar em nossa análise – é dado por uma função que subtrai o expoente de rugosidade do número de dimensões do sistema, $D_f = 3 - \alpha$ ^[01]. Este parâmetro irá permitir a comparação do nosso sistema biológico com os modelos estatístico de Eden e DLA, apresentados no início deste tópico.

O comprimento de correlação foi extraído da superposição da reta que acompanha o crescimento da função w vs L pela reta que acompanha a saturação de w , conforme será mostrado mais adiante. Os resultados mostrados expressam a média de 4 a 8 imagens de cada amostra – isto é, estudamos diferente biofilmes numa mesma amostra - para o cálculo do expoente de rugosidade α e o comprimento de correlação ξ .

A rugosidade do filme de Au nas imagens de AFM é várias ordens de grandeza menor que o biofilme, por isso a sua contribuição para a nossa análise será desprezada.

3.3 Resultados e Análise:

A figura 3.3 mostra imagens de microscopia óptica das amostras de *X. fastidiosa*, onde as setas indicam exemplos típicos de biofilmes de bactérias. Cada imagem representa uma amostra diferente, e destacamos 5, 20 e 30 dias para representar os estádios iniciais, de maturação e de degradação do biofilme, respectivamente.

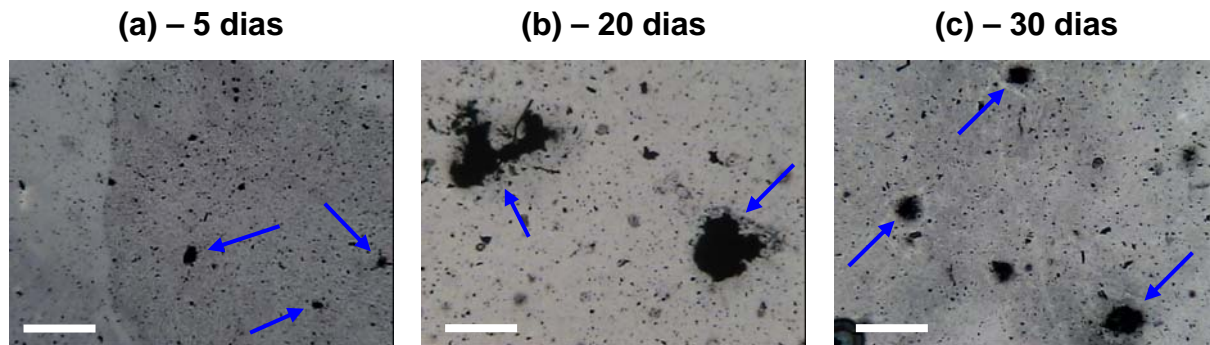


Figura 3.3: Imagens de microscopia óptica de biofilmes de *X. fastidiosa*, com diferentes tempos de crescimento. A barra de escala corresponde a 100 μm .

A tabela 3.1 mostra os valores médios do diâmetro e da distância entre os biofilmes para diferentes tempos de crescimento. Embora exista uma grande dispersão dos valores devido ao pequeno número de biofilmes em cada amostra, ~20, existe uma tendência de aumento dos valores até 20 dias tanto no diâmetro quanto na distância entre os biofilmes. Este resultado indica que, no primeiro estágio de crescimento (5 a 15 dias), existe um processo de competição onde os biofilmes pequenos são eliminados. Note que de 10 para 15 dias o diâmetro aumenta enquanto as distâncias permanecem praticamente as mesmas. Este processo é relatado como um gradiente de nutrientes local causando pelo rápido crescimento dos biofilmes ^[02, 12].

Tempo de Crescimento [dias]	Diâmetro Médio [μm]	Distância Média [μm]
05	81 ± 52	280 ± 150
10	68 ± 25	400 ± 200
15	93 ± 53	420 ± 200
20	111 ± 49	500 ± 250
30	78 ± 26	470 ± 170

Tabela 3.1: Diâmetro médio e distâncias entre os biofilmes calculados através de imagens de microscopia ótica.

Porém, para amostras com tempo de crescimentos maiores do que 20 dias, o diâmetro do biofilme diminui rapidamente, enquanto a distância tem uma leve queda. Este comportamento pode ser atribuído à escassez de nutrientes no meio e ao desprendimento das bactérias do biofilme para a nucleação de novos sítios no substrato.

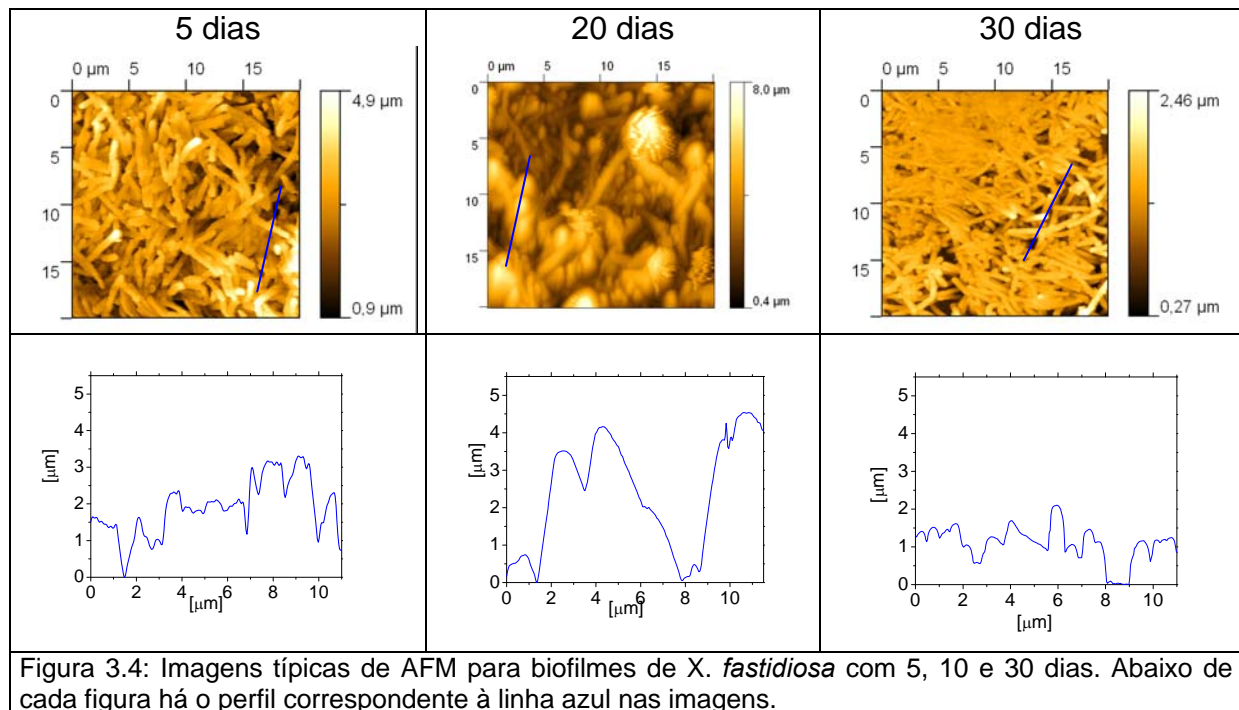


Figura 3.4: Imagens típicas de AFM para biofilmes de *X. fastidiosa* com 5, 10 e 30 dias. Abaixo de cada figura há o perfil correspondente à linha azul nas imagens.

A figura 3.4 mostra imagens topográficas de AFM para amostras após crescimento de 5, 20 e 30 dias. É possível identificar uma parte compacta de bactérias para 5 e 30 dias, enquanto que para 20 dias identifica-se esta parte compacta no fundo,

com grandes estruturas na superfície. Abaixo de cada figura, há um perfil da amostra (linha azul), onde é possível identificar uma diferença de alturas de 2 a 3 μm para 5 e 30 dias, e de $\sim 5\mu\text{m}$ para 20 dias. Estas estruturas observadas em 20 dias sugerem que o *cluster* de bactérias tem uma orientação de crescimento vertical, e que podem estar associados a formação de ramos na superfície causada pela competição de nutrientes [02,04,06,12], além do fato da bactéria poder desacoplar do biofilme de acordo com os modelos mais aceitos [13]. Para as amostras com 30 dias de crescimento, os agregados são menores e a morfologia mostra uma cobertura de bactérias mais homogênea.

As figuras 3.5(a) e (b) mostram imagens típicas de AFM de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, para dois diferentes biofilmes de *X. fastidiosa* numa mesma amostra, com 10 dias de crescimento. A figura 3.5(c) mostra o comportamento da rugosidade em função de L para ambas imagens, com os respectivos ajustes de retas para identificar o expoente de rugosidade (α) e o comprimento de correlação (ξ). Pelas curvas fica claro que, mesmo com estas pequenas áreas de varredura, a saturação da rugosidade ocorre. Através dos ajustes das retas é possível identificar dois valores de α e dois de ξ . O primeiro par de valores, α_1 - e ξ_1 -, estão associados às estruturas de superfície de menor escala. Elas representam as bactérias individuais, uma vez que ξ_1 tem a mesma ordem de grandeza de uma bactéria de *X. fastidiosa*, $\sim 1\mu\text{m}$ [14]. O segundo par de valores está associado (α_2 - e ξ_2 -) à conformação característica do biofilme, ou seja, a forma na qual as bactérias estão se organizando.

Nós obtivemos uma boa correspondência entre os valores de α e ξ obtidos para ambas imagens (uma diferença menor que 5%), indicando que diferentes biofilmes numa mesma amostra tem comportamentos similares. A mesma análise foi feita para diferentes amostras, obtendo resultados similares. A diferença na saturação da rugosidade entre as duas curvas é de $\sim 350\text{nm}$, menor que o diâmetro de uma bactéria ($\sim 500\text{nm}$ [15]), e portanto desprezível caso comparado com a altura total do biofilme, que chegava a $\sim 5\mu\text{m}$ em nossas imagens de AFM.

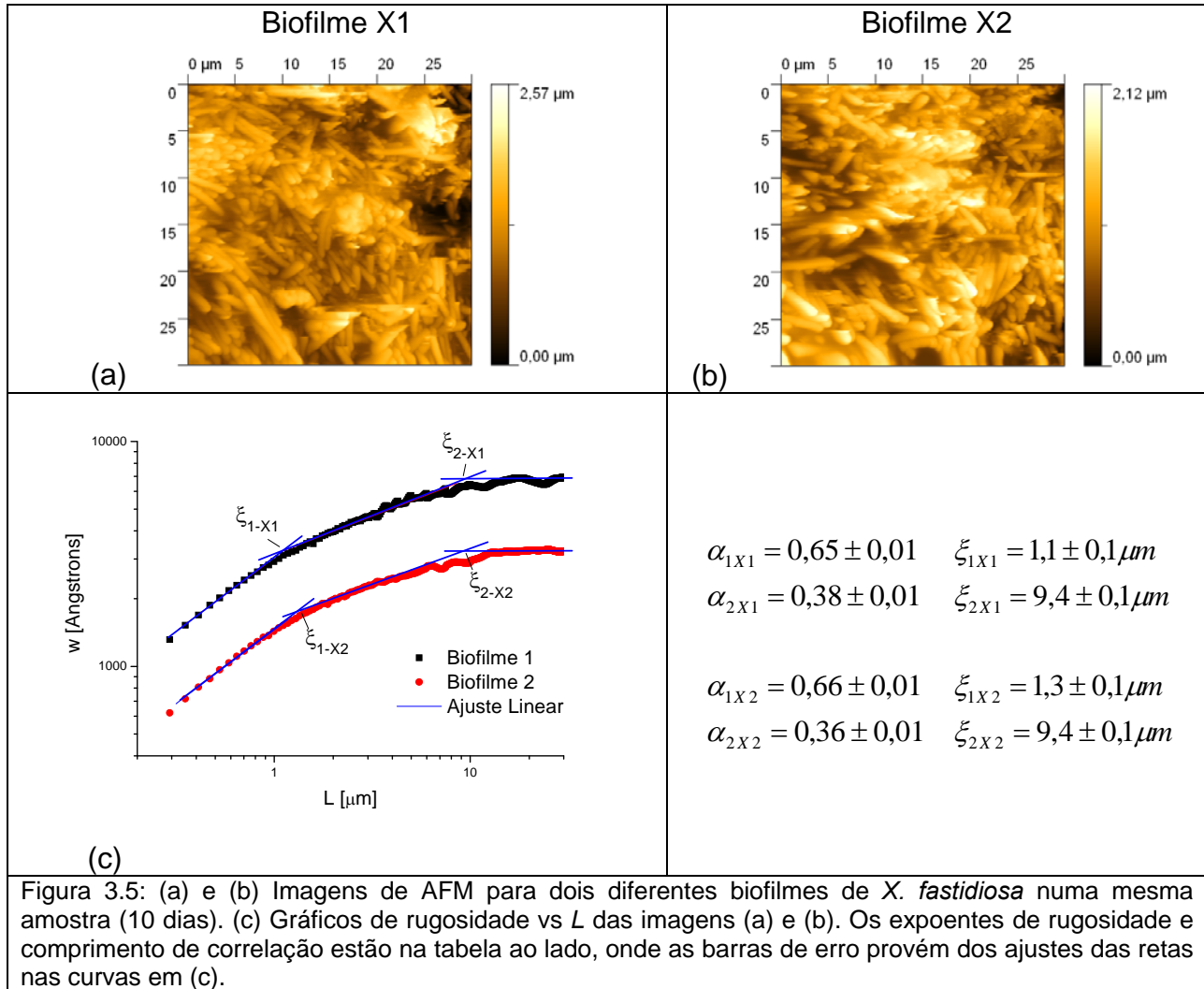


Figura 3.5: (a) e (b) Imagens de AFM para dois diferentes biofilmes de *X. fastidiosa* numa mesma amostra (10 dias). (c) Gráficos de rugosidade vs L das imagens (a) e (b). Os expoentes de rugosidade e comprimento de correlação estão na tabela ao lado, onde as barras de erro provêm dos ajustes das retas nas curvas em (c).

A similaridade estatística observada para biofilmes de uma mesma amostra – como o observado para a figura 3.5 – indica que é coerente analisar curvas de w vs L de diversos biofilmes e calcular valores médios ξ e α . Isto fornece base para a análise fractal de imagens de AFM para biofilmes em diferentes amostras que estão em diferentes estágios de crescimento. A figura 3.6 mostra a dependência da dimensão fractal (D_f) e comprimento de correlação (ξ) para diferentes tempos de crescimento. Neste gráfico os valores mostrados foram obtidos através da média de vários biofilmes numa mesma amostra. A figura 3.6(a) mostra que a dimensão fractal varia entre 2.5 e 2.8, com uma tendência a valores menores em 20 dias. Para os biofilmes com um menor tempo de crescimento, de 5 a 15 dias de inoculação ^[16], o valor da dimensão

fractal variou de $D_f = 2.73 \pm 0.06 \sim 2.66 \pm 0.03$, muito próximo para o valor esperado para o modelo de Eden em três dimensões, $D_f = 2,7$. Por outro lado, para biofilmes mais maduros (~20dias), a dimensão fractal caiu para $D_f = 2.57 \pm 0.08$, um valor próximo para o esperado do modelo DLA ^[14,17,18], $D_f \sim 2.5$. Após este ponto, para a amostra de 30 dias, D_f aumenta para 2.68 ± 0.06 .

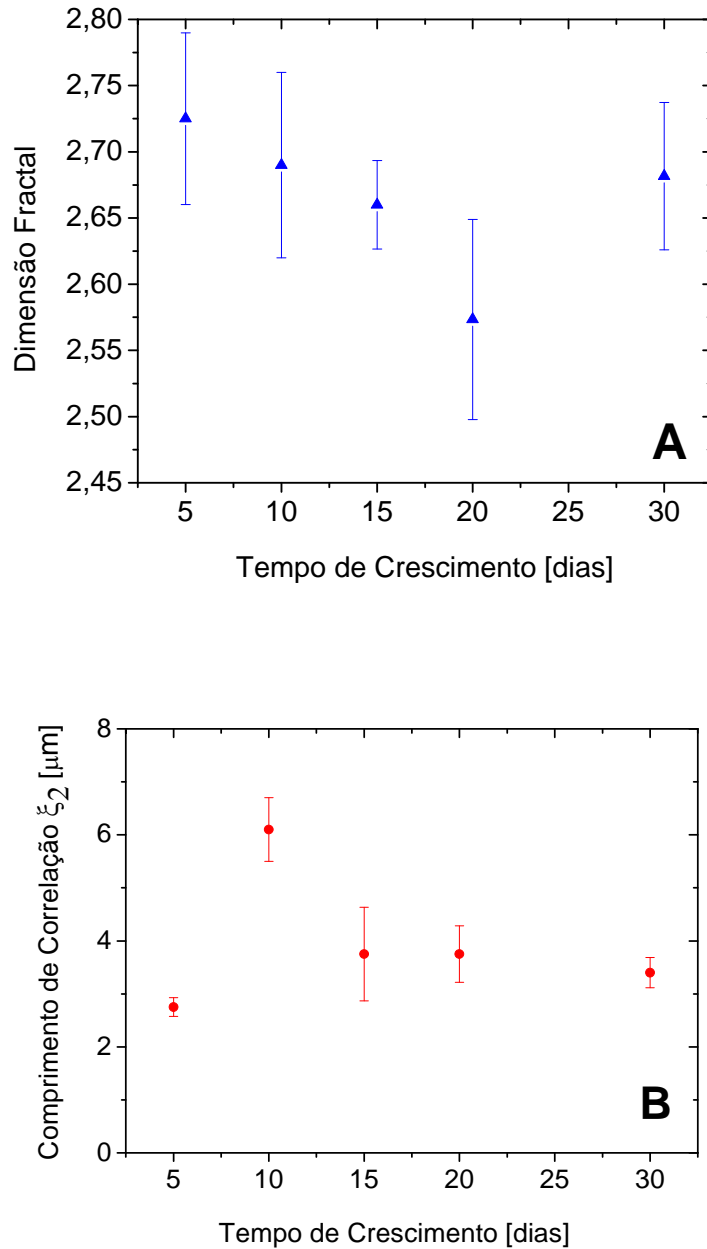


Figura 3.6: (A) dimensão fractal e (B) comprimento de correlação em função do tempo de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa*. As barras de erro refletem a dispersão de diferentes biofilmes numa mesma amostra.

Matsushita et. al.^[29] sugeriram que o crescimento do biofilme é governado primordialmente pela difusão de nutrientes; o recrutamento de novas bactérias que estão soltas no meio é mínimo ^[02,04,12]. Quando a concentração de nutrientes é alta, a divisão celular pode ocorrer aleatoriamente na superfície do biofilme. Pela análise das imagens de microscopia ótica e AFM, verificamos que a formação de biofilmes nas etapas iniciais se dá num ambiente rico em nutriente (alta concentração) o qual não limita o crescimento da colônia. Estas condições são bem descritas pelo modelo de Eden. Todavia os biofilmes maiores, observados para tempos de 20 dias, possuem uma dimensão fractal próxima do modelo DLA. Nós podemos assumir que a difusão de nutrientes pode ter diminuído devido ao tamanho dos biofilmes e à sua arquitetura mais complexa para este caso; uma matriz EPS pode ter promovido uma barreira extra para a difusão de nutrientes. Para estes casos, o efeito blindagem em certas regiões do *cluster*, previsto pelo modelo DLA, pode ser associado para grandes agregados observados nas imagens de AFM (figura 3.4).

Em 30 dias, a D_f aumentou para 2.68 ± 0.06 . Este valor indica que o sistema tende a voltar para o modelo de crescimento tipo Eden. A diminuição dos tamanhos observados na microscopia ótica adicionado com as pequenas áreas observadas por AFM indicam que estes biofilmes estão em processo de degradação, onde a concentração de nutrientes não mais influencia neste crescimento.

Anderson et. al ^[02] estudaram teoricamente o crescimento dinâmico e os padrões espaciais de colônias de bactérias sob condições limites de concentração de nutrientes. Eles chegaram a uma relação de dispersão para o crescimento da interface da colônia, observando que o crescimento local da colônia é proporcional ao fluxo de nutrientes. Eles verificaram que a relação de dispersão mostra que a estabilidade de crescimento depende de quanto os nutrientes penetram na colônia. Para uma baixa taxa de consumo, a distância de penetração é grande, e isto estabiliza o crescimento da colônia numa forma compacta, enquanto para uma alta taxa de consumo a distância de penetração é pequena, o que leva a um crescimento de ramos instável. Nós podemos relacionar este resultado ao comportamento experimental observado em nosso sistema. Com as imagens de microscopia ótica podemos analisar o perímetro do biofilme, enquanto as imagens de AFM permitem o estudo das regiões internas do biofilme,

como mencionado anteriormente. As imagens de microscopia ótica mostram que, para amostras com 20 dias, a maioria dos biofilmes apresenta formatos irregulares, como observado na figura 3.3(b). Este formato irregular pode ser visto – para esta escala de magnificação – como a estrutura de ramos. Para amostras com 5 e 30 dias (como visto nas figuras 3.3(a) e (c)), a maior parte dos biofilmes apresenta um perímetro circular, sugerindo um padrão compacto. Estes resultados correlacionam muito bem com os resultados de leis de escala usando as imagens de AFM, uma vez que formatos circulares são esperados para o modelo de Eden, enquanto o padrão de ramos é associado ao DLA. Nós podemos então sugerir que, em nosso caso, as amostras com pequeno tempo de crescimento (até 15 dias), onde o biofilme está se formando, ocorre uma grande penetração de nutrientes e por isso uma colônia (biofilme) compacta e com formato circular é formada, como esperado no modelo de Eden. Quando o biofilme está formado e chega ao seu estado de maturação (~ 20 dias), o grande número de bactérias juntamente com a formação de uma barreira de EPS, bloqueiam a difusão de nutrientes limitando a sua penetração, levando à formação da estrutura de ramos – associada ao padrão DLA. Após este estágio, o biofilme começa a degradar, e a taxa de consumo de nutrientes cai. Embora a concentração de nutrientes no meio já seja baixa neste estágio, a diminuição do número de bactérias pode compensar este efeito, retornando o biofilme para um formato mais compacto, característico do modelo de Eden.

O processo de crescimento normalmente mostra uma correlação lateral ao longo da superfície, que implica que diferentes sítios na superfície não são completamente independentes, mas dependem das altura dos sítios de sua vizinhança. Estas correlações estão expressas na figura 3.6(b), que mostra a variação do comprimento de correlação em função do tempo. São observados valores entre 2,8 e 4 μm para quatro amostras, com exceção para 10 dias.

De Souza et. al.^[16] descrevem que as colônias de *X. fastidiosa* se transformam em biofilmes – ou seja, toda a colônia fica encapsulada por uma matriz de EPS – entre 10 a 15 dias de inoculação. Podemos associar este fato ao valor de ξ encontrado para 10 dias (~6 μm), uma vez que a formação completa da cápsula de EPS pode mudar a correlação lateral dentro do crescimento, sem alterar drasticamente a sua morfologia

(como observado em imagens de AFM). A diminuição do valor de ξ após 10 dias pode ser interpretado como uma estabilização da produção de EPS.

3.4 Conclusões

Com este estudo, verificamos os mecanismos de crescimento do biofilme de *X. fastidiosa* tendo como fator de *stress* a escassez de nutrientes do meio. Com imagens de AFM e microscopia ótica caracterizamos a sua morfologia, tamanho e distância entre a vizinhança em função do tempo de crescimento. As mudanças observadas podem ser associadas a dois fatores principais: a concentração de nutrientes e a formação de EPS.

Modelos de crescimento, o Eden e DLA, puderam ser associados as propriedades de escala observados, com estruturas típicas de cada modelo, regulares e compactas (Eden) e irregulares e com ramos (DLA).

Além disso, pudemos verificar que com o estudo de uma pequena parcela da superfície do biofilme (imagens de AFM) identificamos estágios da colônia como um todo (maturação e degradação). Isto indica que mesmo que o AFM seja limitado para estudar um biofilme como um todo – pode chegar a diâmetros de 400 μ m, portanto visíveis a olho nú – ele ainda é uma ferramenta útil e pode trazer contribuições importantes para o estudo de pequenas regiões da superfície de biofilmes.

3.5 Referências

- [01] Barabási, A.L.; Stanley, H.E.; Fractal Concepts in Surface Growth, Cambridge University Press (1995).
- [02] Gerlee, P.; Anderson, A.R.A.; Physical Review E, 75, 051911, (2007).
- [03] Meakin, P.; Physical Review A, 27, 1495-1507 (1983).
- [04] Wakita, J.; Komatsu, K.; Nakahara, A.; Matsuyama, T.; Matsushita, M.; J. Phys. Society of Japan, 63, 1205-1211, (1994).

- [05] Jullien, R., Botet, R., Journal of Physics A, 18, 2279-2287 (1985).
- [06] Lopez, J.M.; Jensen, H.J.; Physical Review E, 65, 021903 (2002).
- [07] Marques, L.L.R.; Ceri, H.; Manfio, G.P.; Reid, D.M.; Olson, M.E.; Plant Disease. 86, 633–638, (2002).
- [08] Alves E., "*Xylella fastidiosa* – Adhesion and colonization in xylem vessels of sweet orange, coffee, plum and tobacco, and insect vectors and formation of biofilm on polystyrene surface" Ph.D. Dissertation. Piracicaba – Universidade de São Paulo – USP, Brazil, January 2003.
- [09] Souza, A. A. comunicação pessoal.
- [10] Image J - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- [11] Rao, M.V.H.; Mathur, B.K.; Chopra, K.L.; Applied Physics Letters, 65, 124-126 (1994).
- [12] Matsushita, M.; Fujikawa, H.; Physica A, 168, 498-506 (1990).
- [13] Selhuber, C.; Blummel, J.; Czerwinski, F.; Spatz, J.P.; Tuning Surface Energies with Nanopatterned Substrates. Nano Lett. 6, 267 (2006).
- [14] Stanley, H.E.; Coniglio, A.; Havlin, S.; Lee, J.; Schwarzer, S.; Wolfd, M.; Physica A, 205, 254-271 (1994).
- [15] Wells, J.M.; Raju, B.C.; Hung, H.Y.; Weisburg, W.G.; Mandelcopaul, L.; Brenner, D.J.; International Journal of Systematic Bacteriology, 37, 136-143 (1987).
- [16] Souza, A.A.; Takita, M.A.; Coletta, H.D.; Caldana, C.; Yanai, G.M.; Muto, N.H.; de Oliveira, R.C.; Nunes, L.R.; Machado, M.A.; Fems Microbiology Letters, 237, 341-353 (2004).
- [17] Witten, T.A.; Sander, L.M.; Physical Review Letters, 47, 1400-1403 (1981).
- [18] Stanley, H. E.; Bunde, A.; Havlin, S.; Lee, J.; Roman, E.; Schwarzer, S.; Physica A, 168, 23-48 (1990).

Capítulo 4

Espectroscopia de Força

4.1 Introdução

Neste capítulo mostraremos um estudo da força de interação de um par antígeno-anticorpo. Este sistema é popular na biologia por possuir um tipo de interação específica conhecida como chave-fechadura ^[01], onde o anticorpo irá interagir especificamente com um (ou mais) sítios na superfície de um antígeno específico. Desta forma, caso seja adicionado ao sistema um antígeno não específico a este anticorpo, não haverá o reconhecimento molecular destes sítios, e portanto não ocorrerá uma interação estável entre os dois materiais. A ligação formada depende fortemente da conformação das biomoléculas e envolve forças eletrostáticas, de van der Waals, pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas ^[01]. Entende-se esta última como sendo devido à interação da molécula com o meio, onde regiões hidrofóbicas tendem a diminuir a área de contato com o meio aquoso, e portanto dois sítios hidrofóbicos tendem a permanecer em contato.

O sistema estudado foi fornecido pela prof^a Dagmar Ruch Stach Machado (Instituto de Biologia da Unicamp), onde os antígenos (proteínas) foram extraídos do capsídeo viral do *Citrus Tristeza Virus* (CTV), um vírus patogênico principalmente para plantas cítricas ^[02]. Os anticorpos monoclonais (que interagem especificamente com apenas um antígeno) foram extraídos de um coelho.

Como substrato plano utilizamos o Si e o InP essencialmente por dois motivos: o primeiro é que a ponta do AFM é de SiN_x, portanto uma rotina semelhante de

imobilização poderá ser utilizada para o substrato e a ponta; e o segundo é devido à aplicação destes substratos para o desenvolvimento de biossensores, conforme será discutido no capítulo 5.

Este capítulo está dividido em três partes, as duas primeiras estão associadas ao desenvolvimento do procedimento de funcionalização e imobilização de superfícies semicondutoras, enquanto a última ao estudo da espectroscopia de força.

4.2 Funcionalização de Superfícies Semicondutoras

A funcionalização consiste em ligar quimicamente numa superfície uma camada de moléculas cujos grupos funcionais reajam com o material biológico, de forma a imobilizá-lo à superfície. Um reagente muito utilizado para a funcionalização de semicondutores é o *3-AminoPropilTrietoxi-Silano* (APTES) ^[03]. Este faz uma ligação cruzada com o óxido nativo do semicondutor e o grupamento carboxila da biomolécula (por exemplo uma proteína), promovendo a imobilização. É de extrema importância que a superfície funcionalizada seja homogênea e com baixa rugosidade para que os radicais da superfície estejam ordenados. Isto faz com que ocorra uma ligação eficiente da biomolécula com a camada de reagente.

A princípio o APTES liga-se parcialmente à superfície (figura 4.1), sendo necessário um "tempo de cura" sob aquecimento para que a ligação da terminação etil se realize por completo. Desta forma é possível formar um filme uniforme de poucas camadas onde o grupo funcional NH_2 do APTES fica exposto. O NH_2 reage fortemente com o COOH , geralmente presente em moléculas biológicas.

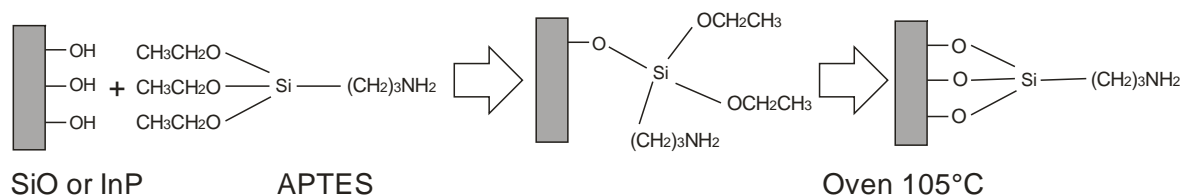


Figura 4.1: Desenho esquemático de como o APTES se liga a uma superfície semicondutora promovendo a silanização.

Utilizamos imagens topográficas de AFM para estudarmos a rugosidade da superfície de Si, InP e Mica (para efeito de comparação) funcionalizadas com APTES. Para cada substrato foram variadas as condições de preparação da amostra conforme será descrito na metodologia a seguir.

Metodologia

Utilizamos um procedimento de limpeza padrão para substratos semicondutores, que consiste na imersão em acetona (5min), seguida pela imersão em isopropanol (5min) com secagem em ambiente de N₂. Foi então utilizado *buffer* HF para remover a camada de óxido antiga do semicondutor, permitindo que uma nova – e uniforme – fosse formada.

Para efeito de comparação, o mesmo procedimento foi realizado num substrato de mica, o qual teve a sua primeira camada clivada para que um plano limpo ficasse exposto.

Para todos os substratos variamos a concentração de APTES, de 0.1% a 10% (porcentagem do volume diluído). Utilizamos como veículo para diluição do APTES o Tolueno.

A solução com APTES foi colocada em *beckers* e aquecida a ~ 70°C em um *hotplate*. As amostras ficaram imersas nesta solução aquecida durante 6h. Os substratos passaram por uma lavagem de tolueno e isopropanol e permaneceram em estufa a 105°C durante 12h.

As amostras foram medidas a seco no AFM *Agilent 5500* em modo não contato usando pontas de SiN_x (NSC14-AIBS da μ Mash).

Resultados e análise

A figura 4.2 mostra uma imagem topográfica de AFM onde a superfície de Mica que foi funcionalizada com APTES 1%. Esta amostra foi preparada apenas para controle, pois como a superfície da Mica é extremamente plana, possibilita a comparação das alturas das estruturas da amostra. Dentre as várias concentrações

preparadas, a de 1% mostrou uma interface na qual a superfície não está totalmente coberta com APTES, de forma que é possível detectar a existência de ilhas com alturas uniformes em torno de 2nm, como mostrado na figura 4.2-A e no perfil da figura 4.2-B. Este comportamento é característico de formação de camadas uniformes na superfície, embora naturalmente tratar-se de mais de uma monocamada, pois o APTES é uma molécula pequena e possui dimensões muito menores do que 1nm^[03]. Existem também grandes aglomerados distribuídos uniformemente na superfície, sugerindo que parte do APTES foi polimerizado e precipitou.

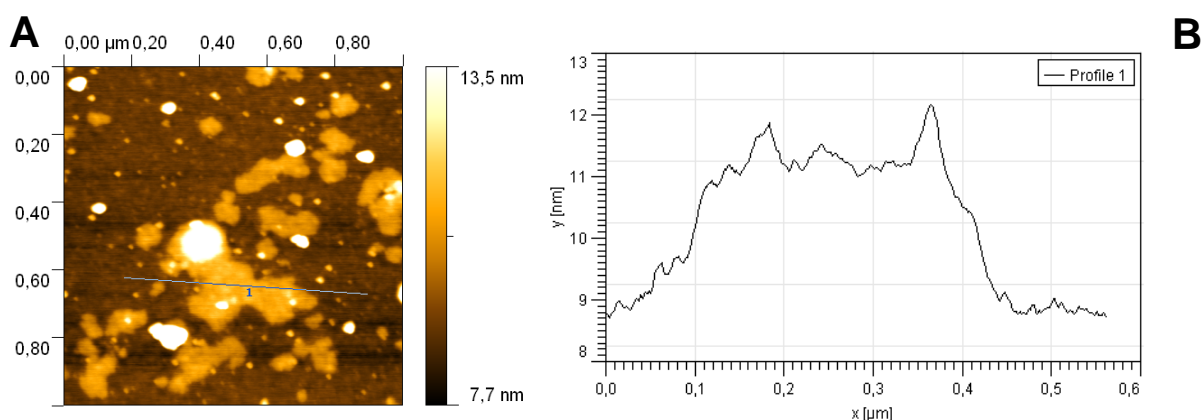


Figura 4.2: (A) Imagem topográfica de AFM de mica com APTES, preparado com tolueno. (B) Perfil indicado na imagem topográfica

Nas figuras 4.3 e 4.4 temos seqüências de imagens para os substratos de Si e InP onde, com exceção das concentrações, o procedimento de funcionalização foi realizado nas mesmas condições que o substrato de Mica. Variamos as concentrações do APTES de 0.5, 1.0, 5.0 e 10%, para ambos os substratos. Nas concentrações de 5 e 10% havia precipitados de APTES visíveis a olho nu tanto no substrato de Si quanto no de InP; estas amostras foram desconsideradas na análise.

Na figura 4.3-A, temos a superfície de Si após a limpeza. Para a amostra de 0.5% (figura 4.3-B) nota-se a formação de ilhas, onde no perfil ao lado é possível identificar um degrau em torno de 3nm (seta) e um segundo degrau com altura em torno de 5nm, indicando o início da formação da camada de APTES, onde a altura do primeiro degrau é semelhante ao substrato de Mica (figura 4.2). Quanto à amostra

APTES 1% (figura 4.3-C), identificamos uma cobertura uniforme de APTES em toda superfície.

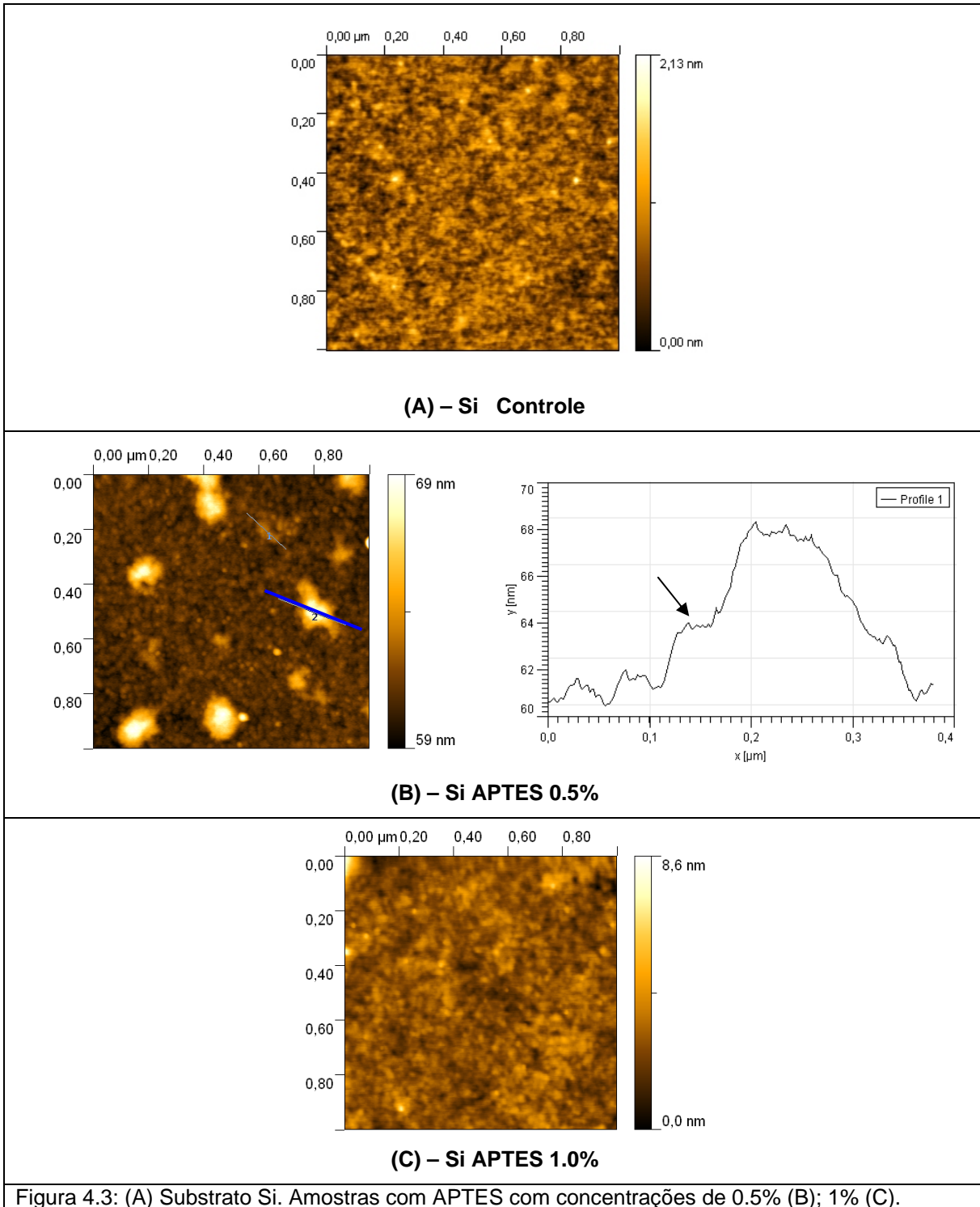


Figura 4.3: (A) Substrato Si. Amostras com APTES com concentrações de 0.5% (B); 1% (C).

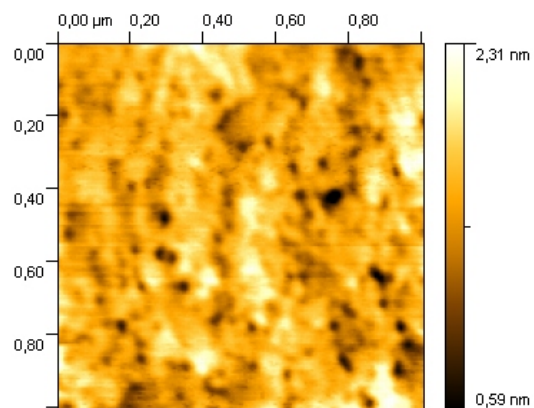
Amostra	Rugosidade [nm]
Si controle	0.2±0.03
Si 0,5% APTES	1.5±0.2
Si 1.0% APTES	0.7±0.2

Tabela 4.1

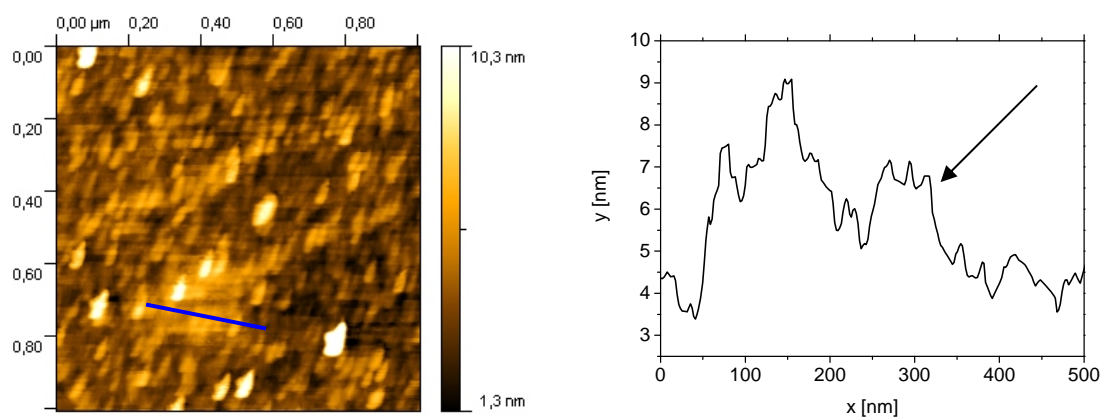
A tabela 4.1 mostra a rugosidade das imagens. Embora tenha apenas duas concentrações diferentes, é possível identificar um aumento da rugosidade do início da formação das ilhas para a concentração de 0.5% (1.5nm), onde temos uma camada incompleta de APTES. Na sequência a rugosidade diminuiu para 0.7nm onde a camada de APTES aparentemente cobriu totalmente a superfície.

Fazendo uma análise semelhante para o substrato de InP, a figura 4.4 mostra imagens de AFM das amostras controle, 0.5, e 1.0% de APTES. Novamente, é possível observar o início da formação da camada de APTES na amostra 0.5% APTES (figura 4.4-B), onde o perfil mostra um degrau de ~ 2,5nm, próximo ao da mica. Na sequência, para a amostra de 1.0% de APTES existe uma granulação uniforme na superfície (figuras 4.4 C).

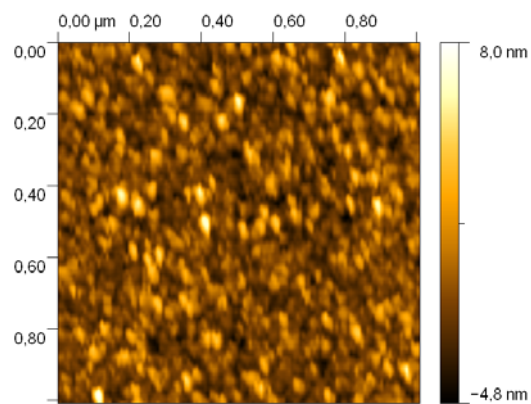
A tabela 4.2 mostra a rugosidade das amostras de InP. Ao contrário das amostras de Si, o InP não forma um pico na rugosidade quando há o início da formação das camadas de APTES, em 0.5%. Mas há uma tendência de manter a rugosidade até o fim do recobrimento da superfície por APTES, 1.8 e 1.7nm para 0.5 e 1.0% APTES respectivamente. Em 0.5%, o valor da rugosidade do Si e InP foram próximas, 1.5 e 1.8nm respectivamente, porém quando houve o recobrimento total da superfície em 1% de APTES, o valor da rugosidade do Si diminuiu para 0.7nm, enquanto o InP se manteve em 1.7nm.



(A) - InP Controle



(B) – InP 0,5% APTES



(C) – InP 1,0% APTES

Figura 4.4: (A) Substrato InP. Amostras com APTES com concentrações de 0.5% (B); e 1.0% (C)

Amostra	Rugosidade [nm]
InP controle	0.2±0.04
InP 0,5% APTES	1.8±0.2
InP 1.0% APTES	1.7±0.1

Tabela 4.2

Para ambos substratos detectamos o aumento da rugosidade com a adição de APTES, que indica que este reagente está aderindo à superfície e portanto, possivelmente, estas estão sendo funcionalizada. As imagens mostram que a formação completa da camada de APTES nas amostras ocorre em 1% APTES, porém aparentemente para o substrato de Si o filme formado está mais uniforme, isto devido à sua baixa rugosidade em relação ao InP para as amostras com APTES 1%. Embora as rugosidades de Si e InP controle sejam próximas, ou seja, apresentam camada de óxido nativo com uniformidade semelhante, este estudo indicou empiricamente que o Si forma uma camada de APTES mais uniforme, e, como veremos na sessão 4.5 isto possivelmente favoreceu a imobilização de material biológico na superfície.

Desta forma, para as próximas etapas deste trabalho, iremos utilizar o procedimento acima desenvolvido para a funcionalização de substratos de Si e InP com APTES, ou seja, para ambos iremos utilizar uma concentração de 1% de APTES em tolueno, nas condições descritas na metodologia.

4.3 Imobilização de antígenos e anticorpos em superfícies semicondutoras

Uma vez desenvolvido o procedimento para a funcionalização do Si e InP com APTES, vimos que com uma concentração de 1% de APTES temos a formação de camadas sobre toda a superfície do semicondutor.

Como próxima etapa, é necessário imobilizar o material biológico na superfície. Utilizamos o anticorpo AB37 (37.d.09) que interage especificamente com o antígeno CB22 ^[04] cujas concentrações foram os mesmos (padrões) que o grupo do prof. Lauro Tatsuo Kubota (Instituto de Química – Unicamp) utiliza para experimento de SPR

(*Surface Plasmon Resonance*). O SPR é uma técnica que também necessita a imobilização do material numa superfície [5].

A figura 4.5 mostra um esquema de como as amostras foram preparadas. As etapas A e B mostram os processos de limpeza e funcionalização, já discutidos na sessão 4.2. A etapa C mostra a adição do material biológico diluído em um tampão salino com pH 7.2 (PBS - *Phosphate buffered saline*). Foram preparadas tanto amostras com o anticorpo AB37 (15µg/ml) quanto com o antígeno CB22 (20µg/ml) imobilizados na superfície.

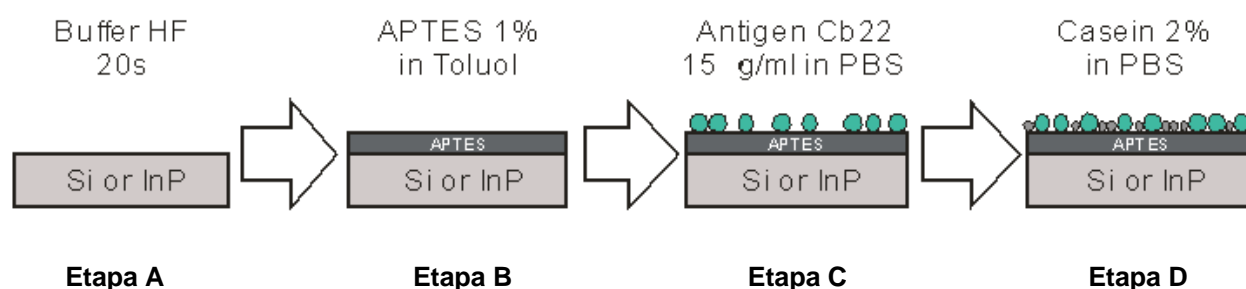


Figura 4.5: Desenho esquemático da funcionalização e imobilização de substratos de Si e InP.

O radical amina (NH_2) do APTES reage fortemente com moléculas biológicas; como queremos medir a interação específica entre antígeno-anticorpo, é importante bloquear as terminações amina para que estas não interfiram em nossas medidas.

Para tanto é necessária a adição de moléculas que inibem o NH_2 do APTES (figura 4.5 - Etapa D); em ensaios de ELISA é comum utilizar o aminoácido Caseína (2% em PBS) para esta finalidade [04].

Por se tratar de macromoléculas e interações específicas, um anticorpo irá interagir com uma pequena fração da superfície do antígeno, de forma que se o antígeno ou anticorpo não ficarem com o sítio de interação expostos no momento em que foram imobilizados, a interação poderá não ocorrer. Trabalhamos com áreas das amostras semicondutoras de $\sim 4 \times 4 \text{ mm}$. Podemos então afirmar que trabalhamos com populações de antígenos e anticorpos, de maneira que é necessário estudar se parte destas populações estão *biologicamente ativas* (termo utilizado para indicar que as moléculas biológicas estão no seu estado nativo).

Além das medidas de espectroscopia de força que serão apresentadas na próxima sessão, utilizamos análise bioquímica independente para auxiliar nossos estudos e verificar se estas moléculas estão biologicamente ativas. Ensaios com a técnica ELISA – bem estabelecido como referência na área – serão apresentados a seguir.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Este ensaio constitui-se num método para quantificar um antígeno ou anticorpo primário imobilizado em uma superfície sólida. Um anticorpo secundário específico com uma enzima ligada de forma covalente em sua base (vide figura 4.6 A), faz uma única ligação específica no antígeno ou anticorpo primário imobilizado na superfície. O papel desta enzima é pela mudança de coloração de um substrato de pNPP (*phosphatase substrate*) que é adicionado ao meio. Desta forma, a quantidade de antígenos/anticorpos primários imobilizados é proporcional à quantidade de anticorpos secundários, que por sua vez possuem a enzima que colora o substrato pNPP (uma solução). Através de espectrofotometria é possível identificar a intensidade da cor do substrato pNPP e com isso determinar a concentração de antígenos imobilizados na superfície.

Uma vez que o anticorpo secundário é produzido por um camundongo, este é popularmente conhecido como antimouse.

As amostras foram preparadas em substrato de Si ou InP (com dimensões ~ 2x2mm) funcionalizados com APTES 1%, onde o antígeno CB22 ou o anticorpo AB37 foi imobilizado. Após a imobilização, as amostras foram bloqueadas com caseína.

Para os ensaios de ELISA, utilizamos um antimouse que reconhece o anticorpo AB37. Todo material mencionado acima foi fornecido pela professora Dagmar Machado.

Os ensaios de ELISA foram modificados em relação ao padrão para adaptação às nossas amostras. Ao invés de utilizarmos poços com material polimérico que imobilizam o anticorpo (como o padrão, figura 4.6B) ^[06], utilizamos substratos de Si ou InP funcionalizados com APTES para a imobilização. Os substratos já funcionalizados

foram colocados dentro de *ependorfs*, e o ensaios de ELISA foram realizados dentro dos mesmos. Ao funcionalizarmos os substratos, não apenas a sua face superior mas toda a sua superfície ficava em maior ou menor grau encoberta por APTES. Durante a clivagem dos substratos, nem sempre todos os pedaços ficavam do mesmo tamanho, e por isso tínhamos uma grande variação da sua área superficial, e portanto uma variação considerável da quantidade de anticorpos imobilizados. Isto limitou um pouco a técnica, conforme iremos discutir mais adiante, optamos por não caracterizar a quantidade de anticorpos/antígenos imobilizados, mas apenas se havia uma quantidade detectável dos mesmos na superfície.

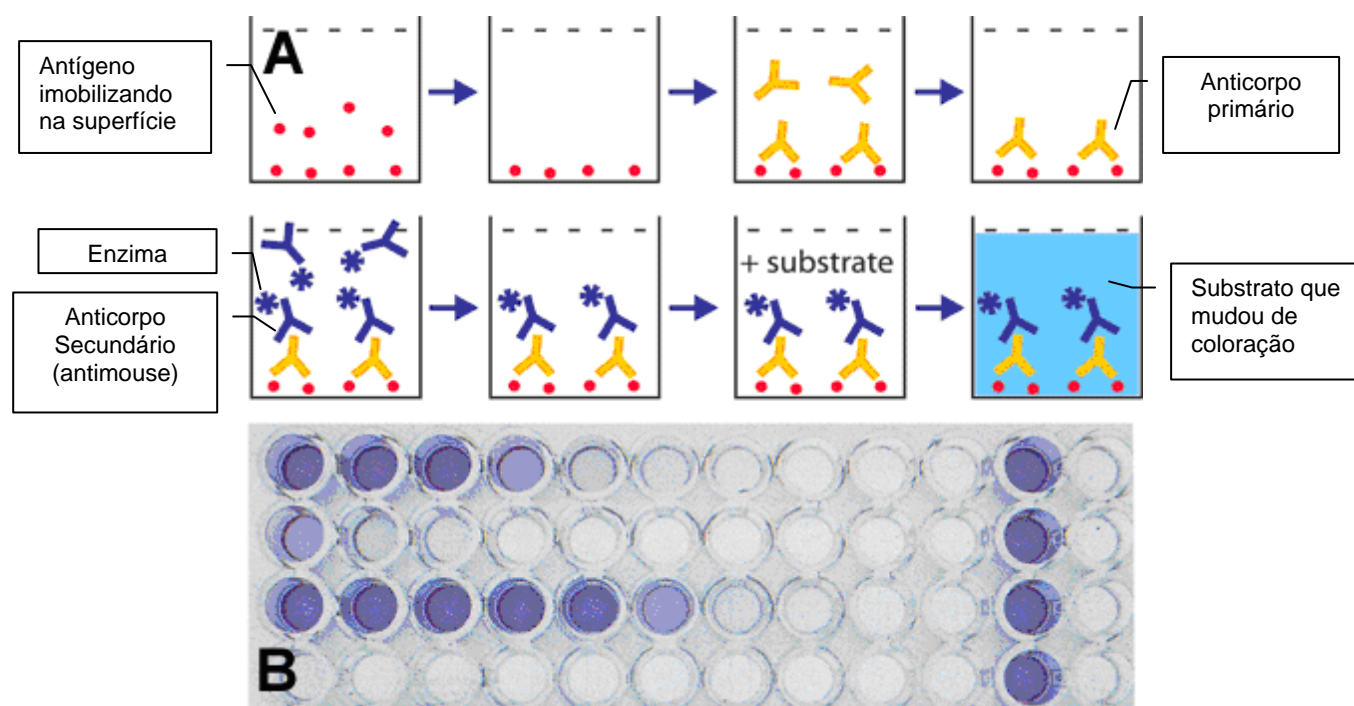


Figura 4.6 : (A) Desenho esquemático do ensaio de ELISA. (B) Poços de material polimérico onde o experimento é realizado. Este material é tratado de forma que sua superfície fique carregada positivamente, e isto adere eletrostaticamente os anticorpos primários. Os poços com solução azul indicam a mudança de coloração do substrato e portando a existência dos anticorpos primários. A intensidade da coloração indica a concentração de anticorpos^[06].

As amostras já com o material biológico imobilizado e bloqueado foram imersas em 150µl de antimouse (1:10000 em PBS) durante 1h em estufa à temperatura fisiológica (37°C). Após, foram submetidas à uma lavagem cuidadosa com PBS – para não deixar resíduos de antimouse no recipiente – e colocadas em 200µl de substrato

pNPP (Sigma) durante 1h em estufa. Após a reação, 100µl do substrato pNPP foi recolhido para a leitura de Densidade Óptica (D.O.).

Resultados e análise:

Conforme foi descrito anteriormente, o antimouse tem que fazer uma ligação específica com o anticorpo para se fixar na amostra. Porém é possível que o antimouse se ligue em regiões não específicas da superfície que não são de nosso interesse. Nestes casos o ELISA pode sinalizar a presença de anticorpos primários sem que eles realmente estejam na amostra. Chamamos estes casos de “falso positivo”. Para verificar se o falso positivo estava ocorrendo, um par de amostras controle foram funcionalizadas com APTES, que tem forte interação com biomoléculas. Uma amostra era bloqueada com caseína enquanto a outra não. Na amostra bloqueada espera-se um resultado negativo, enquanto para a amostra não bloqueada, que dê falso positivo. A ideia é verificar se a caseína está bloqueando todas as ligações não específicas que o antimouse pode fazer, sobrando apenas as ligações específicas dos anticorpos.

O nosso sistema foi calibrado com estes controles, nos quais com o *negativo* esperávamos uma resposta mínima da D.O, enquanto para o *positivo* uma resposta máxima. Adotando como zero a resposta do *negativo* e 1 como resposta do *positivo*, normalizamos o nosso sistema.

Imobilizações em substratos de Si e InP:

A tabela 4.3 representa as amostras preparadas utilizando substrato de Si e InP, com o resultado esperado e as respectivas densidades ópticas normalizadas. Uma vez que este ensaio de ELISA é modificado (depende também da área do substrato), não arriscamos estimar o volume de material biológico imobilizado, mas sim se houve ou não imobilização do material. Durante os nossos ensaios com ELISA, observamos que algumas amostras sem antimouse tiveram um sinal de fundo na D.O. de ~ 0.02. Como veremos adiante, todas as nossas respostas foram, pelo menos, dez vezes maior que este sinal de fundo, sendo que este não nos induzirá a falsas conclusões.

Analisando os resultados apresentados na tabela 4.3, observa-se que as amostras controle A e B sinalizaram nitidamente conforme o esperado, confirmando que os nossos resultados não são falso positivos, e que o bloqueio de caseína está sendo eficiente.

	Amostra – Substrato de Si ou InP	Resultado Esperado**	D.O.*** Substr. InP	D.O. Substr. Si
A – Controle	APTES	Falso Positivo	1.00	1.00
B – Controle	APTES – caseína*	Negativo	0.02	0.00
C	APTES – AB37 – caseína*	Positivo	0.36	0.65
D	APTES – CB22 – caseína* – AB37	Positivo	0.44	0.25
* Bloqueio **Positivo = antimouse foi imobilizado; Negativo = antimouse não foi imobilizado. ***Densidade Óptica normalizada em relação aos controles				

Tabela 4.3: Ensaio de ELISA para imobilização em substratos de Si InP.

A amostra C indica que houve imobilização significativa do anticorpo AB37 ambos os substratos. Para verificar a imobilização do antígeno CB22 na superfície – uma das condições necessárias para as medidas de espectroscopia de força – utilizamos a técnica conhecida como “ELISA sanduíche” na literatura^[01]. Esta consiste em imobilizar o antígeno CB22 e na sequência adicionar anticorpos AB37 que irão interagir com este antígeno. Uma vez que o antimouse não interage especificamente com este antígeno, utilizamos o anticorpo AB37 que possui afinidade com o CB22, que por sua vez se liga com o antimouse em questão. Desta forma foi possível detectar indiretamente que o antígeno CB22 imobilizou na amostra, conforme indica a amostra D da tabela 4.3.

Os resultados da tabela 4.3 mostram que os materiais biológicos foram imobilizados nas superfícies planas de Si e InP, e que existe uma população detectável que está biologicamente ativa. Isto indica que o processo utilizado é funcional e que é adequado para as medidas de espectroscopia de força, que serão mostradas na sessão 4.5.

4.4 Funcionalização e imobilização de anticorpos em pontas de AFM

Para o tratamento das pontas de AFM (ML06-Veeco, alavanca E, $k=0,1\text{N/m}$), utilizamos o mesmo procedimento utilizado para os substratos de Si e InP descrito nas sessões 4.2 e 4.3. Desta forma, a figura 4.7 representa esquematicamente as etapas de preparação da ponta, iniciando da ponta limpa (etapa A), funcionalizada com APTES (B), imobilizada com anticorpos (C) e bloqueada com caseína (D).

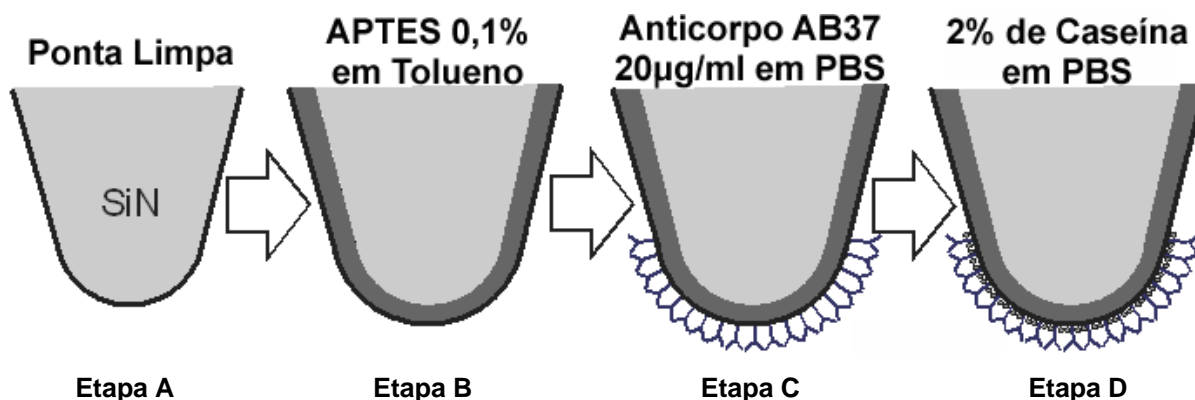
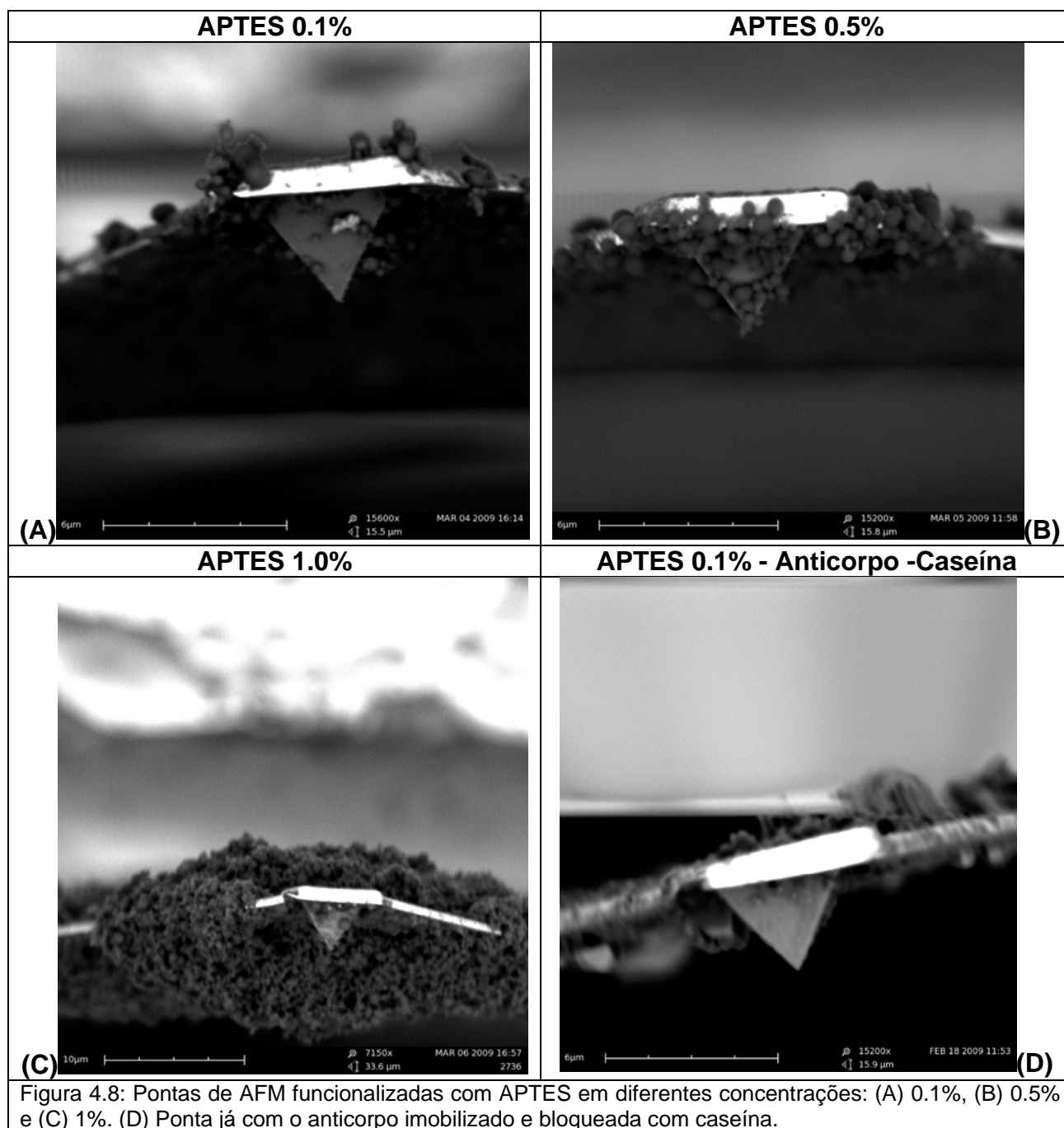


Figura 4.7: Desenho esquemático da funcionalização e imobilização da ponta de AFM.

Fizemos um breve estudo para verificar a uniformidade do filme de APTES na ponta, e verificamos – usando imagens Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV com o equipamento *Phenom* da *FEI Company*) – que para concentrações de APTES de 1% ocorria uma aglomeração deste reagente polimerizado na ponta e principalmente na alavanca, inviabilizando-a para as medidas de força (figura 4.8 C). Isto fazia com que as medidas de força da espectroscopia fossem não específicas, e com forças muito mais altas do que o esperado (da ordem de dezenas de nN).

Para resolver o problema, diminuímos a concentração de APTES em tolueno, de 1% para 0,1% e 0,5%, e analisamos as imagens de MEV das pontas (figura 4.8 A e B).



Embora seja possível identificar sinais de polimerização em todas as pontas, a ponta com 0.1% de APTES teve a extremidade livre da polimerização. Caso o filme de APTES tenha se formado em toda a sua superfície, temos uma ponta apropriada para as medidas de força.

A imagem 4.8 D mostra uma ponta funcional, com o anticorpo imobilizado e o APTES bloqueado com caseína. Repare que a extremidade da ponta continua desimpedida para as medidas e – caso o anticorpo esteja biologicamente ativo – esta ponta é própria para as medidas de força. Durante a manipulação desta ponta, uma das bases da alavanca triangular rompeu, e por isso a ponta está inclinada. Uma vez que a ponta continuou íntegra, este dano na alavanca não prejudicou o estudo das imagens em MEV. Nenhuma das pontas deste estudo foi (re)utilizada para as medidas de espectroscopia de força.

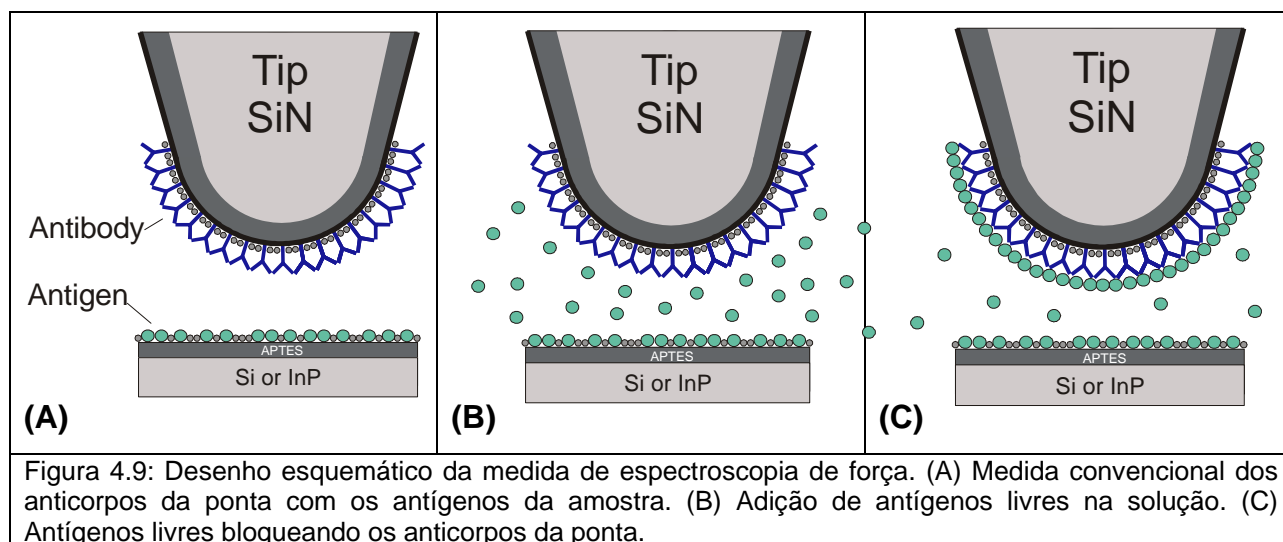
Desta forma verificamos que a concentração ideal de APTES em tolueno para a funcionalização de pontas é de 0.1%, e que os processos de imobilização e bloqueio foram uniformes. A extremidade da ponta de AFM é uma estrutura nanométrica; a única forma de certificarmos se ela é funcional é através das medidas de espectroscopia de força, conforme iremos discutir na próxima sessão.

4.5 Espectroscopia de força: interação antígeno-anticorpo

O AFM permite realizar o estudo de forças de interação entre moléculas biológicas imobilizadas em sua ponta com as moléculas imobilizadas na superfície de uma amostra.

Imobilizamos os antígenos CB22 nos substratos de Si e InP, enquanto para a ponta imobilizamos o anticorpo AB37. O motivo pelo qual utilizamos substratos semicondutores como suporte para os antígenos será esclarecido no capítulo 4, onde utilizamos estes como plataformas para o desenvolvimento de biossensores. O nosso objetivo neste capítulo é medir as forças de interação específicas entre antígeno e anticorpo. Porém esperamos que outras interações não específicas entre outras moléculas do sistema também ocorram, como por exemplo as interações caseína-caseína, caseína-anticorpo e caseína-antígeno. Desta forma, durante as medidas teremos um resultado das interações específicas (antígeno-anticorpo) e interações não específicas. A figura 4.9-A representa esquematicamente esta medida.

Para verificar a contribuição das forças específicas durante as medidas, foi adicionado o antígeno CB22 livre na solução de forma que ele se ligasse permanentemente ao anticorpo da ponta (figuras 4.9 B e C). Desta forma os anticorpos seriam impedidos de interagir com os antígenos da amostra, bloqueando a interação específica entre eles. Assim haverá a troca de uma interação específica antígeno-anticorpo para uma não específica antígeno-antígeno, e queremos verificar se esta mudança influencia de forma detectável nas medidas da espectroscopia de força – uma diminuição da força ^[07]. Este processo bloqueia permanentemente a ponta, inutilizando-a para este tipo de experimento.



Metodologia

Funcionalizamos e imobilizamos um total de seis pontas para os experimentos (ML06-Veeco, alavanca E, $k=0,1\text{N/m}$), onde apenas uma delas não se mostrou funcionalizada (sem resposta nas medidas de força, possivelmente devido a danos no processo). Destas pontas duas foram utilizadas para medidas em substrato de Si e três para substratos de InP (tanto o Si quanto o InP tiveram as suas superfícies funcionalizadas e imobilizadas conforme descrito na sessão 4.2).

As medidas foram realizadas dentro de uma célula de volume 60mL contendo tampão PBS. Esta célula possui canais que permitem a entrada e saída de solução

dentro do meio, tornando viável a injeção do antígeno livre (na concentração de 20µg/ml).

Todas as alavancas tiveram a sua constante de mola recalibrada por um processo de flutuação térmica. Este processo está descrito no apêndice 1 desta tese.

O período do ciclo da medida de força foi de 1s, e o deslocamento vertical da ponta era da ordem de 50 a 100nm. As forças foram medidas em conjuntos de 10 em 10 ciclos, variando para cada conjunto a região da amostra.

Resultados e Análise

A figura 4.10 mostra uma curva típica do deslocamento da ponta pela força detectada, semelhante à mostrada na figura 2.5. Note que na aproximação não é possível detectar a força atrativa de van der Waals. Esta força tem origem a partir da interação entre dipolos elétricos, e como estas medidas estão sendo realizadas em meio aquoso (tampão PBS) e portanto com moléculas polares, os dipolos da solução blindam esta interação, tornando-a indetectável no nosso sistema. Já no afastamento da ponta é possível detectar um pico de força de aproximadamente 0,5nN. Este pico mostra certa irregularidade ao se desprender as amostra (comparado à figura 2.5). A seta azul indica a existência de duas inclinações no regime em que a alavanca está defletida para baixo. Além disso, no momento em que a ponta se solta do substrato, isto não se dá de maneira uniforme pois observamos degraus na curva representados pela seta vermelha na figura. Isto sugere que a ponta não está soltando abruptamente da amostra, e portanto que ela está se soltando por partes da superfície.

O fato destas medidas terem sido feitas em meio líquido – tampão PBS – também pode ter contribuído com a dispersão que é observada na figura 4.10 devido à interação do meio com as superfícies da ponta-amostra. Esta interação pode ser entendida como um trabalho de adesão entre duas superfícies (ponta-amostra) que se encontram num terceiro meio (tampão PBS)^[09]. Conforme já havíamos mencionado anteriormente, medidas em meio de tampão PBS são condição necessária para que as moléculas biológicas estejam em seu estado nativo (*in vitro*). Uma vez que esta

condição foi repetida durante todo o estudo, podemos considerar a influência do meio como um *background* em nossas medidas, tornando viável o seu estudo comparativo.

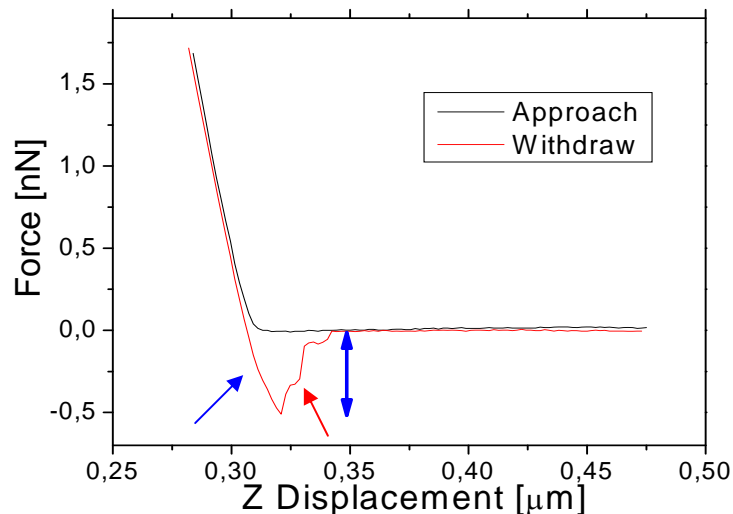


Figura 4.10: Gráfico típico de força vs distância da interação antígeno-anticorpo. A curva preta mostra a deflexão da alavanca no momento em que a amostra se aproxima da ponta, enquanto a vermelha, no momento em que a amostra se afasta da mesma. As setas azul e vermelha mostram instabilidades na curva, que podem estar associadas ao desprender da amostra.

Para cada ciclo de aproximação e afastamento, era possível detectar um padrão diferente de degraus na curva de força pelo deslocamento. Isto gerou uma dispersão na medidas de força que pode ser visto nos histogramas da figura 4.11.

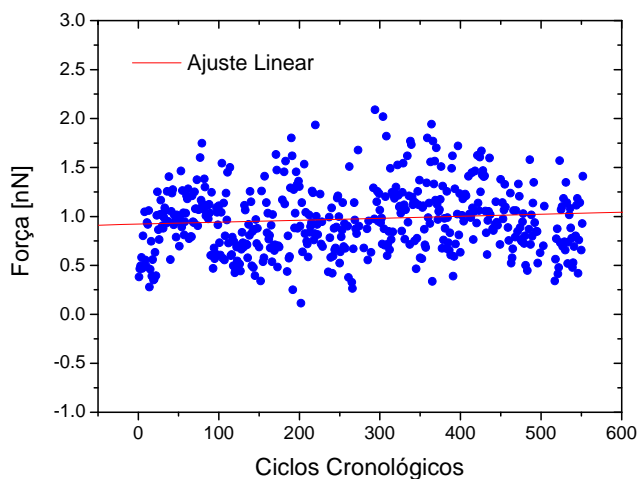


Figura 4.11: Medidas em ordem cronológica com a ponta funcionalizada com anticorpos AB37 e amostra com antígenos CB22

A figura 4.11 mostra uma sequência de mais de 500 ciclos de medidas de força em seis regiões diferentes da amostra (em ordem cronológica) para o par antígeno-anticorpo em substrato de Si. O ajuste linear (reta vermelha), mostra qualitativamente que embora tenha uma dispersão grande, aparentemente a força se mantém constante. Um comportamento semelhante foi observado para o substrato de InP. Isto indica que o desgaste da ponta devido ao contato com a amostra está sendo mínimo e portanto podemos desprezar este efeito para a análise que será apresentada a seguir.

As figuras 4.12A e B mostram os histogramas dos resultados de mais de 450 ciclos de força vs distância medidos para a interação antígeno-anticorpo em amostras de Si e InP. Para a amostra de Si utilizamos dois pares de pontas/amostras diferentes, enquanto para o InP três pares diferentes. Estes histogramas representam a sobreposição de todas as medidas para os diferentes pares.

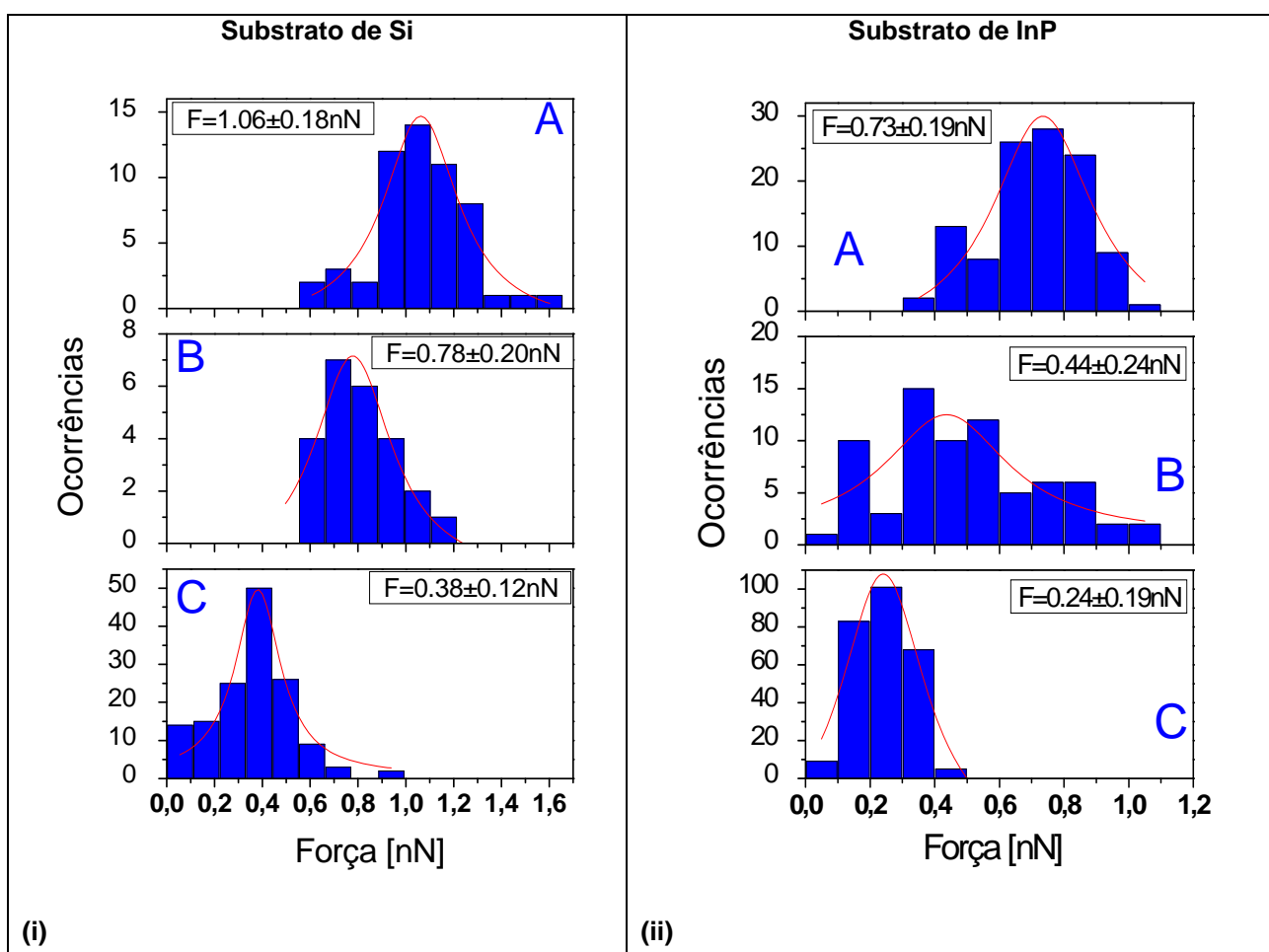


Figura 4.12: Histogramas das medidas de força do sistema antígeno-anticorpo feitas por AFM para o Si (i) e para o InP (ii). Histograma A: interação antígeno-anticorpo; Histograma B: adição de antígenos livres na solução; Histograma C: após 20 min da adição dos antígenos.

Os histogramas A, tanto de para o Si quanto para o InP, mostram a distribuição de forças antes de colocarmos os antígenos livres na solução. Já para os histogramas B houve o início da adição do antígeno livre na solução, enquanto para os histogramas C o antígeno livre já havia sido totalmente inserido, e estava atuando na solução há pelo menos 20min.

Pelo ajuste das Lorentzianas nos histogramas, vemos que os valores iniciais de forças médias iniciaram em 1.06 ± 0.18 e 0.73 ± 0.19 nN (Si e InP respectivamente); após o início da injeção do antígeno na solução eles caíram para 0.78 ± 0.20 e 0.44 ± 0.24 nN, e por fim estabilizaram em 0.38 ± 0.12 e 0.24 ± 0.19 nN.

Houve então uma queda no valor da força de 64% para o Si e 67% para o InP (representando a passagem dos histogramas A para o C) após a injeção do antígeno livre. Esta queda da força sinaliza que o antígeno livre na solução está “impedindo” que a ponta imobilizada com o anticorpo interaja com o antígeno do substrato, diminuindo assim a força de interação. Em outras palavras, estamos trocando uma interação específica antígeno-anticorpo por uma não específica antígeno-antígeno, e isto está causando uma queda no espectro de forças claramente detectável.

Os histogramas B estão representados apenas de forma ilustrativa, pois apesar de indicarem que a força está diminuindo, não tivemos o controle do fluxo de antígenos que era adicionada na célula líquida, apenas da sua concentração final.

As forças medidas para o substrato de Si foram maiores do que para o InP (foram aproximadamente 50% maiores para os histogramas A e C), ou seja, pode-se dizer que para o Si houve uma maior imobilização de material biológico, e que este foi bloqueado pelo antígeno livre proporcionalmente em cada uma das situações. Desta forma, mesmo o InP tendo uma menor imobilização que o Si, ele se comportou de maneira semelhante. Ressaltando que as condições experimentais foram as mesmas para os dois substratos, isto é um indicativo que o Si tem melhor afinidade para funcionalizar e imobilizar material biológico do que o InP, ao menos com o procedimento utilizado neste trabalho.

4.6 Imagens topográficas do *Citrus Tristeza Virus*

As pontas de AFM com os anticorpos AB37 imobilizados, podem ser utilizados como um bionanossensor, o qual utiliza as propriedades mecânicas da alavanca – sua deformação elástica – como elemento sensor para a detecção. Desta forma, é possível detectar uma interação específica conforme foi descrito na seção anterior.

Devido à sua dimensão, este sensor pode ser utilizado para detecção de estruturas nanométricas, como por exemplo a superfície do capsídeo viral do CTV, no qual o anticorpo utilizado tem interação específica.

Para que este estudo fosse possível utilizando AFM, foi necessária a imobilização do vírus CTV numa superfície plana, a mica. Este material é formado por diversos planos de silicato sobrepostos que, quando clivados, expõem cargas negativas que interagem com a matéria^[10]. Caso o capsídeo possua cargas predominantemente positivas, este poderá interagir eletrostaticamente com a superfície da mica ficando imobilizado. Caso estas cargas sejam negativas, por intermédio de um cátion de Mg^{2+} , podemos promover a imobilização.

A seguir, faremos um breve relato dos resultados que obtivemos deste estudo.

Metodologia

A solução com CTV, fornecida pela prof^a Dagmar Machado, foi diluída água deionizada 18M Ω na proporção de 1:1, e uma mica circular (*Ted Pella, diâmetro 7mm*) foi clivada expondo um plano limpo.

Preparamos dois tipos de amostras: (i) uma diretamente em cima da mica, onde adicionamos 4 μ l de solução com CTV, aguardando 5min; e outra (ii) em que adicionamos $MgCl_2$ (10 μ l durante ~ 10s), para a formação da camada de cátions Mg^{2+} , e após isso inserimos a solução com CTV nas mesmas condições que o ítem anterior. O motivo destas duas preparações é de descobrir o tipo de carga predominante da superfície do capsídeo.

Lavamos delicadamente o substrato com água deionizada, e secamos as amostras em atmosfera de N_2 . As amostras foram medidas em AFM em modo não contato com pontas NSC14 da $\mu Mash$ em ar.

Análise e discussão

Para todas as amostras, foram observadas grandes quantidades de estruturas com características biológicas aderidas à superfície (figura 4.13-A). Estas estruturas foram encontradas com mais frequência em amostras com $MgCl_2$, indicando que estas tinham cargas predominantemente negativas.

Pela análise de dimensões, detectamos que a altura média destas estruturas eram de $\sim 2\text{nm}$, enquanto esperávamos encontrar $\sim 10\text{nm}$ para vírus de CTV^[04]. As alturas encontradas estão compatíveis às de DNA dupla fita^[01], e, acrescentando o fato da conformação característica, podemos concluir que se tratam de tais estruturas.

Em raras situações, encontramos estruturas com dimensões e conformação condizentes aos CTV (figura 1-B). Acreditamos que isto foi ao acaso, e que existe pouca (ou nenhuma) interação do vírus com a superfície da mica independentemente do $MgCl_2$.

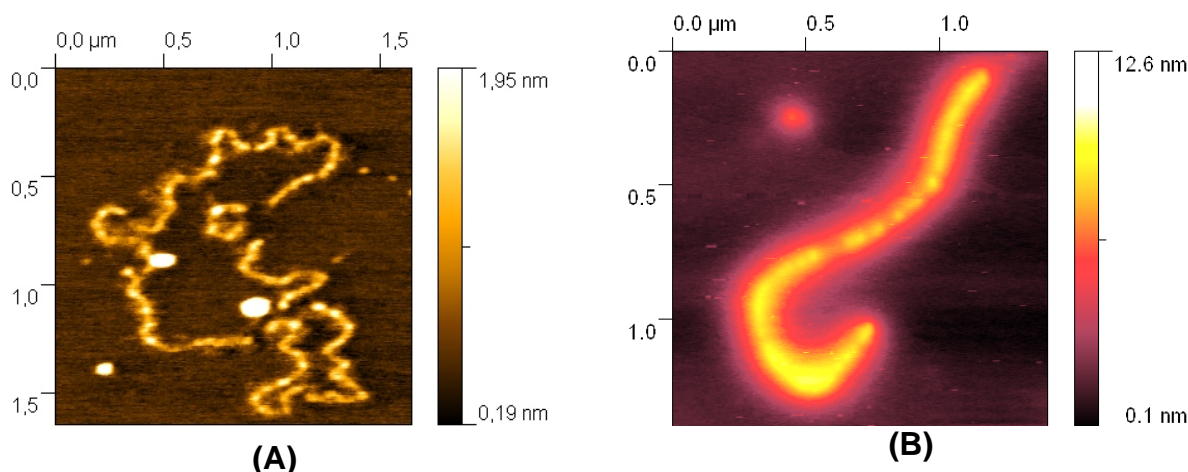


Figura 4.13: Imagens de AFM da amostra com vírus CTV. (A) Estrutura biológica com dimensão de DNA (altura $\sim 2\text{nm}$). (B) Estrutura com dimensão de CTV ($\sim 10\text{nm}$).

Conclusão

Verificamos que na solução com CTV existe uma população de DNAs que interagem com o substrato de Mica com $MgCl_2$, sendo facilmente detectados nas imagens de AFM, indicando que estes tem cargas predominantemente negativas.

Dos poucos CTVs encontrados, acreditamos que a interação eletrostática entre o capsídio e a mica não estava sendo suficiente para aderí-lo à superfície, e que os poucos casos encontrados tratava-se de mera precipitação do vírus. Além disso existe a hipótese das amostras estarem degradadas, e que o capsídio viral tenha se desestruturado despejando o material genético na superfície.

Uma vez não encontramos um procedimento eficiente para a imobilização do CTV numa superfície plana, e que possivelmente as amostras estavam degradadas, não foi possível dar continuidade a este estudo.

4.7 Conclusão Parcial

As imagens topográficas de AFM possibilitaram o estudo da funcionalização de superfícies semicondutoras de Si e InP com APTES. Para isso, conseguimos desenvolver um procedimento simples que formava um filme uniforme de reagente em suas superfícies. Já os ensaios de ELISA identificaram que os antígenos e anticorpos imobilizados nas amostras de Si e InP continuavam ativos. O desenvolvimento deste processo teve importância não apenas para a maior confiabilidade das medidas de espectroscopia de força, como também é de fundamental importância para o desenvolvimento de biossensores semicondutores que será apresentado no capítulo 5 desta tese.

O procedimento desenvolvido para a funcionalização de pontas para AFM demonstrou ter boa reprodutibilidade e ser funcional. O aproveitamento de preparação destas pontas foi de 80%. Até o momento, poucos artigos na literatura o utilizam e nenhum com o aproveitamento tão bom quanto o nosso ^[08].

As medidas de espectroscopia de força indicaram que predominantemente as forças detectadas são referentes à interações específicas de antígenos-anticorpo,

confirmando que os anticorpos da ponta do AFM continuavam ativos. Para as amostras de Si e InP as medidas identificaram uma maior sensibilidade do Si para a imobilização do antígeno, embora o InP também tenha tido uma clara resposta à interação com o anticorpo.

Este estudo tem uma poderosa aplicação na área de nanobiossensores. Uma vez que os anticorpos foram imobilizados na ponta de AFM uma varredura em cima de uma superfície (em *tapping mode*) nos traria informações de quais sítios possuem interações específicas com o material imobilizado na ponta, e com isso poderíamos fazer um mapeamento de interações específicas da amostra. Esta amostra pode ser, inclusive, o capsídeo do vírus CTV do qual foram retirados os antígenos utilizados neste trabalho. Este tipo de medida, contudo, não pode ser concluída nesta tese pela dificuldade em imobilizar o material biológico (vírus) numa superfície.

4.8 Referências

- [01] Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Cellular and Molecular Immunology; Saunders, Fifth Edition, (2005).
- [02] Román, M.P.; Cambra, M.; Juárez, J.; Moreno, P.; Duran-Vila, N.; Plant Disease; 453 – 467 (2004).
- [03] Etienne, M.; Walcarius, A.; Talanta 59, 1173 –1188, (2003).
- [04] Dias, Letícia Chaves; “*Caracterização Imunoquímica dos anticorpos monocloais que reconhecem proteínas do capsídeo viral do vírus da tristeza dos citrus do complexo Capão Bonito*”; Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Unicamp.
- [05] Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G.; Sensors and Actuators B, 54 3–15, (1999).
- [06] <http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/agabint.html>
- [07] Tiefenauer, L.; Ros, R.; Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 23 (2002) 95–114; (2002).
- [08] Riener, C.K.; Stroh, C.M.; Ebner, A.; Klampflb, C.; Gall, A.A.; Romanina, C.; Lyubchenko, Y. L.; Hinterdorfer, P.; Gruber, H.J.; Analytica Chimica Acta, 59–75 (2003).
- [09] Israelachvili, J.; *Intermolecular and Surface Forces*. New York: Academic (1992).
- [10] Deer, W. A.; Howie, R. A.; Zussman, J.; *An Introduction to the Rock Forming Minerals*, Longman, (1966).

Capítulo 5

Biossensores em semicondutores de InP

5.1 Introdução

Nos últimos anos, muitos estudos mostraram que uma camada de moléculas quimicamente organizada numa superfície semicondutora cristalina pode ser usada para influenciar as propriedades elétricas deste semicondutor ^[01]. Em particular, semicondutores cristalinos do tipo III-V possuem características químicas e elétricas que possibilitam que estes sirvam de plataformas para análises gasosas e em solução, de forma que podem ser explorados como sensores químicos e biológicos.

No capítulo 4 vimos que tanto o Si quanto o InP possuem afinidade para imobilizar o material biológico em suas superfícies, e que este material continua biologicamente ativo. Com base nestes resultados, mostraremos neste capítulo um biossensor montado a partir de um substrato de InP, utilizando o mesmo sistema antígeno-anticorpo (CTV) utilizado para as medidas de espectroscopia de força.

O funcionamento deste dispositivo tem como elemento sensor a mudança das propriedades eletrônicas do semicondutor, e é possível fazer uma analogia do funcionamento deste sensor com o funcionamento de um transistor tipo FET (*field-effect transistor*). Resumidamente falando, um transistor FET, em geral, é um dispositivo de três terminais onde o canal de resistência entre dois dos contatos é controlado por um terceiro. A figura 4.1-A mostra um FET onde o canal de portadores de carga é controlado capacitivamente por um campo elétrico (daí o nome efeito de campo).

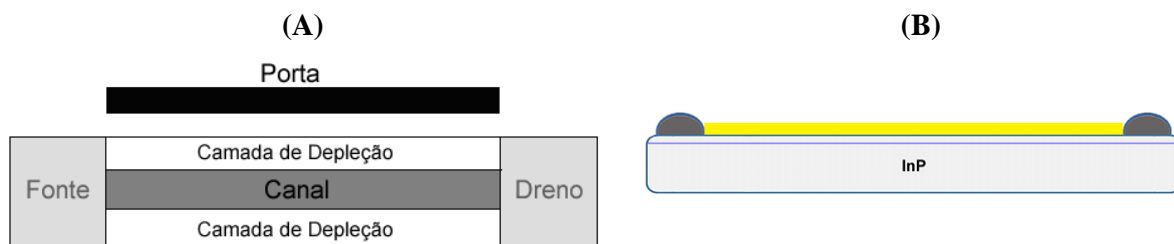


Figura 5.1: (A) Esquema de um transistor FET, onde a camada de depleção acima do canal será modulada através de uma tensão aplicada na porta do dispositivo. (B) Vista em perfil de um substrato de InP, com uma fina camada de InP epitaxial dopado na superfície.

No FET o fluxo de elétrons (ou de buracos) da fonte para o dreno é controlado pela modulação do tamanho e formato do canal de condução criado e influenciado pela tensão aplicada na porta. Num dispositivo tipo n, uma tensão negativa da porta causa uma expansão da largura da região de depleção (vide figura 5.1-A) e estrangula o canal de condução, diminuindo o fluxo de portadores de carga. Caso contrário, se a tensão for positiva da porta para a fonte, o canal de condução se expande e o fluxo de cargas irá aumentar. Desta forma, alterando a tensão da porta, alteramos a resistência do canal de condução. Dentro de uma faixa de tensão, a corrente fonte-dreno será proporcional à tensão aplicada entre os respectivos contatos; neste caso o dispositivo estará operando em regime ôhmico ou linear ^[02,03].

No caso do biossensor, o canal de condução é um filme de InP epitaxial com uma dopagem residual tipo n de $\sim 10^{16}\text{cm}^{-3}$. Dois contatos de índio são colocados nas extremidades do dispositivo (figura 5.1-B) e uma tensão é aplicada nestes terminais. A região de depleção dentro do material será modulada através de uma camada de material biológico que é imobilizada na superfície (camada amarela da figura 5.1-B), como veremos mais adiante, a quantidade de antígeno imobilizada que caracterizará o biossensor. A mudança na distribuição de cargas resultante de ligações específicas anticorpo-antígeno corresponde a uma mudança de polarização que irá aumentar ou diminuir a região de depleção, desta forma aumentando ou diminuindo a resistência do biossensor. Assim, caso se possa caracterizar esta mudança de resistência, é possível detectar a quantidade de material imobilizado.

Para o sistema antígeno-anticorpo, a superfície da amostra de InP foi preparada utilizando o procedimento descrito no capítulo 4. A figura 5.2 mostra um esquema do biossensor funcional, onde uma vez adicionada uma solução contendo antígenos CB22, esperamos observar a variação da resistência nos terminais da amostra.

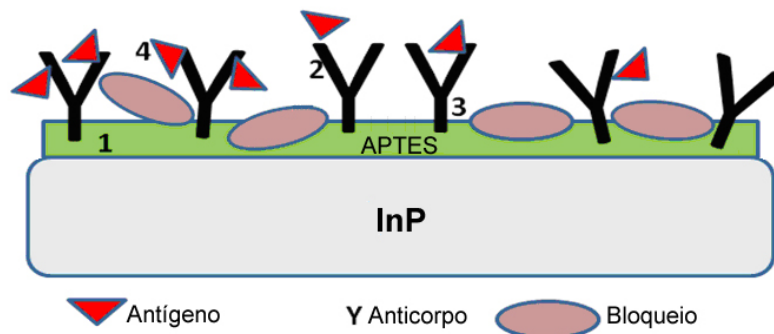


Figura 5.2: Esquema da formação da camada de APTES com as interações esperadas. 1 – Formação da camada com APTES; 2 – Imobilização de anticorpos; 3 – Bloqueio de sítios livres com caseína; 4 – Interação antígeno-anticorpo.

5.2 Metodologia

Utilizamos um substrato semiconductor InP (100), no qual foi crescida uma camada com espessura de $\sim 300\text{nm}$ de InP (tipo n) por CBE (*Chemical Beam Epitaxy*, ou Epitaxia por Feixe Químico) com baixa concentração de portadores ($\sim 10^{16}\text{ cm}^{-3}$). Esta configuração é similar à utilizada para sensores de gás fabricados em InP [04]. A possibilidade de fazer este crescimento com o InP foi o motivo pelo qual escolhemos este substrato (ao invés do Si, que apresenta melhor razão custo/benefício) para o estudo do biossensor.

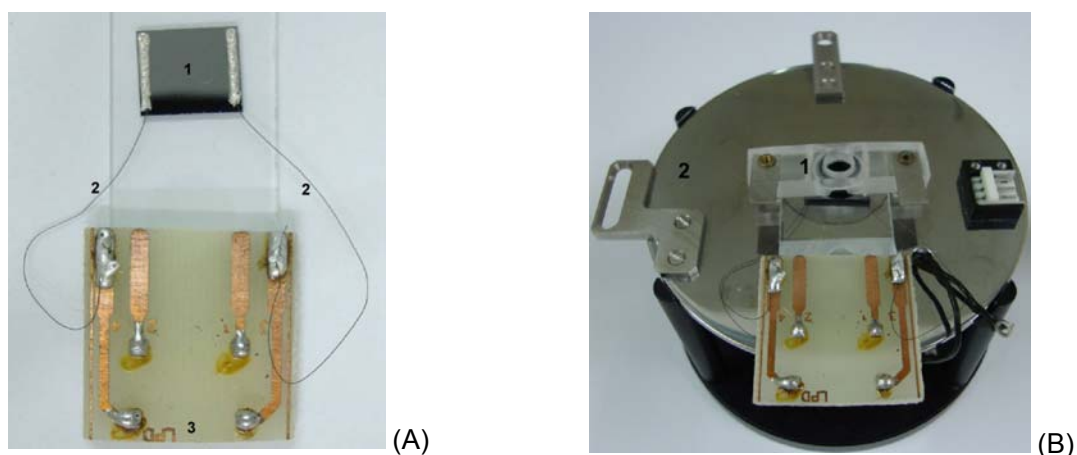


Figura 5.3: Montagem do biossensor (A) 1 – Chip de InP ($\sim 9 \times 8 \text{ mm}^2$) com contatos de In. 2 – Fios de Cu. 3 – Placa de circuito para conectar a fonte de corrente. Todos estes componentes estão sob uma lâmina de vidro. (B) 1 – Célula líquida. 2 – Disco de suporte para medidas.

Através de contatos de *In* nas extremidades do substrato (figura 5.3-A), foram soldados fios de Cu a uma distância de 7mm e ligados a um picoamperímetro Keithley (modelo 6487). Estes contatos passaram por tratamento térmico (450°C durante 15min em atmosfera de N₂) para criar, por difusão, uma zona rica em In no filme fazendo com que os contatos ficassem ôhmicos, conforme veremos mais adiante.

O substrato foi clivado em dimensões de ~ (9x8)mm² e adaptado a uma célula líquida, para que os processos de imobilização pudessem ser realizados (figura 5.3-B). Após cada processo (imobilização e bloqueio) a superfície era lavada com tampão PBS (pH 7,2), e a célula líquida era preenchida por esta mesma solução. O anticorpo AB37 foi imobilizado inicialmente na superfície, para que interagisse especificamente com o antígeno CB22, na sequência.

Abaixo temos uma curva típica de corrente por tensão do semiconductor utilizado sem que houvesse qualquer material imobilizado em sua superfície. Dentro da varredura de -100mV a 100mV a curva tem um comportamento ôhmico. Logo podemos calcular a resistência do semiconductor através do inverso do coeficiente angular da reta.

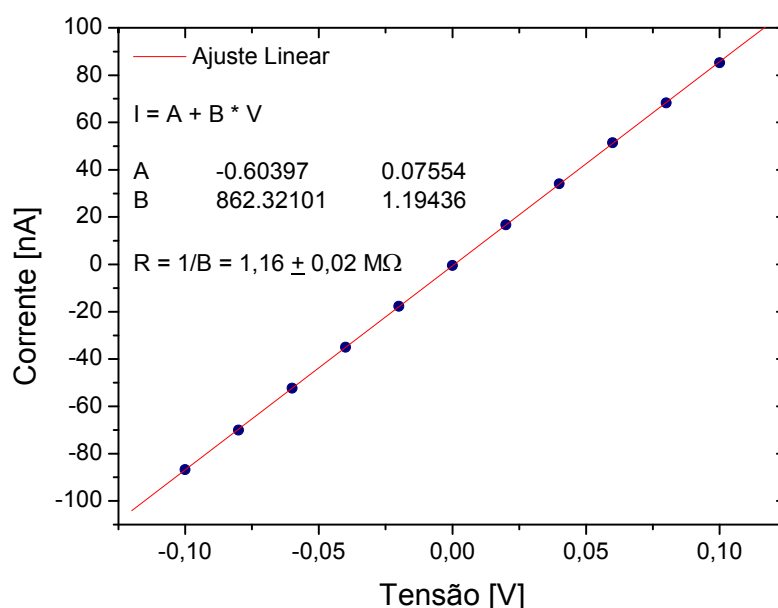


Figura 5.4: Curva típica de tensão-corrente do substrato de InP funcionalizado com APTES. Em destaque o ajuste da reta e o cálculo da resistência através do inverso do coeficiente angular da reta. O erro representado pelo ajuste representa menos de 2% da medida. Este erro foi propagado juntamente com o erro da dispersão da resistência obtendo um erro total das medidas.

Para a funcionalização e imobilização de material biológico na superfície do semicondutor, foi adotado o mesmo processo utilizado para as medidas de força, já descrito no capítulo 4.

A tabela 5.1 mostra brevemente todas as etapas de preparação da amostra, nas quais foram feitas aquisições das medidas de resistência. Para cada etapa existe um tempo de aquisição específico, durante o qual as medidas de resistência foram levantadas a partir de 5 a 10 curvas feitas alternando o sinal da polarização. Isto foi feito para minimizar efeitos de capacitância gerados pelos íons do *buffer* salino.

Tabela 5.1

	Etapas	Descrição	Tempo de Medida
1	InP	Semicondutor	20 min
2	InP-APTES	Reagente de funcionalização da Amostra	20 min
3	InP-APTES-PBS	Tampão Salino	20 min
4	InP-APTES-AB37-PBS	Anticorpo – 100µl	90 min
5	InP-APTES-AB37-Caseína	Aminoácido que bloqueia ligações não-específicas (radicais de NH ₂)	60 min

Após as etapas descritas na tabela 5.1, o biossensor já está operacional. Para o estudo deste biossensor fizemos três baterias de medidas, cada uma com uma finalidade de estudo: a resposta, a reprodutibilidade, e a especificidade.

Tanto a concentração do antígeno bem como o tempo em que este atuou no biossensor foram variados. Iremos apresentar e justificar estas variações ao longo deste capítulo.

5.3 Resultados e Análise

Dividimos esta seção em três tópicos, onde no primeiro discutimos a variação da resistência durante o processo de funcionalização e imobilização do biossensor. Em seguida verificamos sua resposta e reprodutibilidade e por último a especificidade e sensibilidade do mesmo.

i) Funcionalização e imobilização do biossensor.

O gráfico da figura 5.5 mostra a variação da resistência do biossensor em função de cada uma das etapas descritas na tabela 5.1.

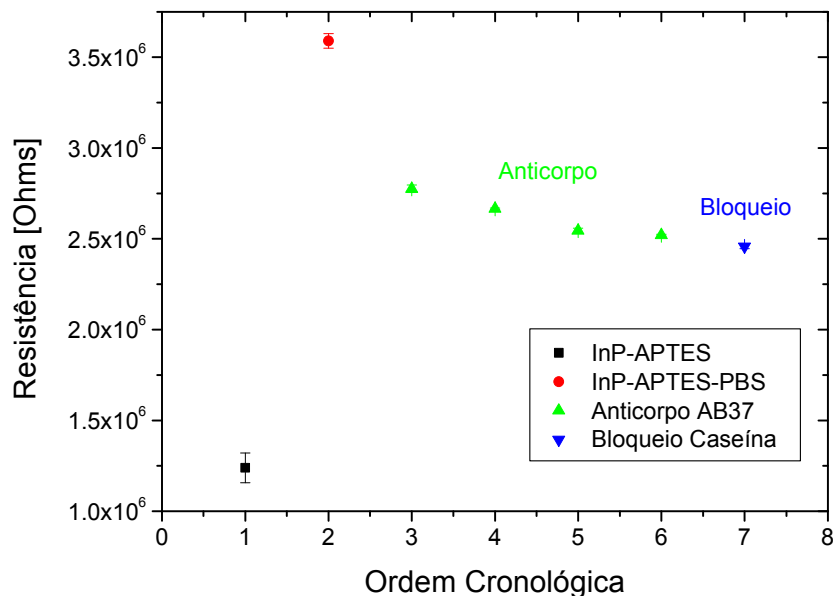


Figura 5.5: Variação da resistência durante o processo de preparação do biossensor.

O filme de InP sem a funcionalização possui uma resistência de $37 \pm 1 \text{ k}\Omega$. Por ser duas ordens de grandeza menor que as medidas apresentadas na Figura 5.5 ($\sim \text{M}\Omega$), este ponto não foi representado no gráfico. O grande aumento da resistência demonstra a sensibilidade do dispositivo ao ter a sua superfície funcionalizada pelo filme de APTES, sugerindo que este filme tem uma carga líquida e que esta influencia (diminui) fortemente o transporte de carga no semiconductor.

Ao colocarmos o tampão PBS na célula líquida (InP-APTES-PBS – ponto vermelho no gráfico) a resistência aumentou de $1,23 \pm 0,08$ para $3,59 \pm 0,04 \text{ M}\Omega$, ou seja, praticamente triplicou. Uma vez que este tampão é salino, os íons desta solução se comportam como partículas carregadas que influenciam no transporte de cargas no semiconductor. Todas as etapas seguintes tiveram a célula líquida preenchida por este tampão, de forma que podemos considerar esta resistência como um *background* das nossas medidas.

Após a adição do anticorpo AB37 na célula líquida (pontos verdes), a resistência foi medida de 20 em 20min para acompanhar o processo de imobilização. Houve uma diminuição da resistência para $2,52 \pm 0,01 \text{ M}\Omega$ após 80min. Isto é um indício que houve imobilização do anticorpo na superfície (o que já foi confirmado pelas medidas de ELISA no capítulo 4). A pequena variação de $2,52 \pm 0,01$ para $2,46 \pm 0,01 \text{ M}\Omega$ da resistência ($\sim 2\%$) após o bloqueio com a caseína (ponto azul) mostra que praticamente toda a superfície já havia sido preenchida com anticorpo, sobrando poucos sítios ativos para interagir com a

caseína. Isto é um bom resultado, pois quanto mais anticorpos tivermos imobilizados à superfície, maior será a sensibilidade e resposta do biossensor. A partir desta etapa, o biossensor está funcional.

ii) Resposta e sensibilidade do biossensor.

O gráfico da figura 5.6-A mostra a resposta em função do tempo do *biossensor 1* para doses de antígenos CB22 adicionadas na célula líquida. A concentração de antígeno na célula líquida foi aumentada de 100 em 100 ng/ml nas três primeiras etapas, até que na última usamos uma concentração de 2000ng/ml. A análise apresentada a seguir, fizemos um estudo das variações da resistência em relação do primeiro ponto da curva ($2,46 \pm 0,01 M\Omega$) onde não existia interação com o antígeno ($\Delta R/R_0$).

A curva mostra que a resistência aumentou à medida em que foi adicionado antígeno na célula líquida, chegando a ~55% para a concentração de 300ng/ml. Esta resposta se manteve para a concentração de 2000ng/ml, confirmando que a saturação da resposta do biossensor ocorre em torno deste valor.

As duas primeiras doses de antígeno – 100 e 200ng/ml – tiveram comportamentos semelhantes, onde para a primeira dose houve um aumento de 25% enquanto para a segunda o aumento foi de aproximadamente 50%. A variação da resistência foi proporcional a concentração de antígenos pode ser um indicativo que o dispositivo tem uma resposta linear. Este fato é de grande vantagem para a calibração do biossensor. Em ambos os casos, com cerca de 20min decorridos após a adição do antígeno, o biossensor respondeu com aproximadamente 2/3 da resposta relativa a cada dose. Este é um indicativo do tempo de resposta do dispositivo.

A figura 5.6-B mostra as curvas dos *biossensores 1* e *2*. O *biossensor 2* foi o primeiro dispositivo que teve resposta significativa, e teve todas as condições de preparação semelhantes ao *1*. A melhor estabilidade do *biossensor 1* em relação ao *2* é devido a otimização do tratamento térmico dos contatos de In, que favoreceu a difusão dos átomos de In no InP diminuindo a resistência de contato.

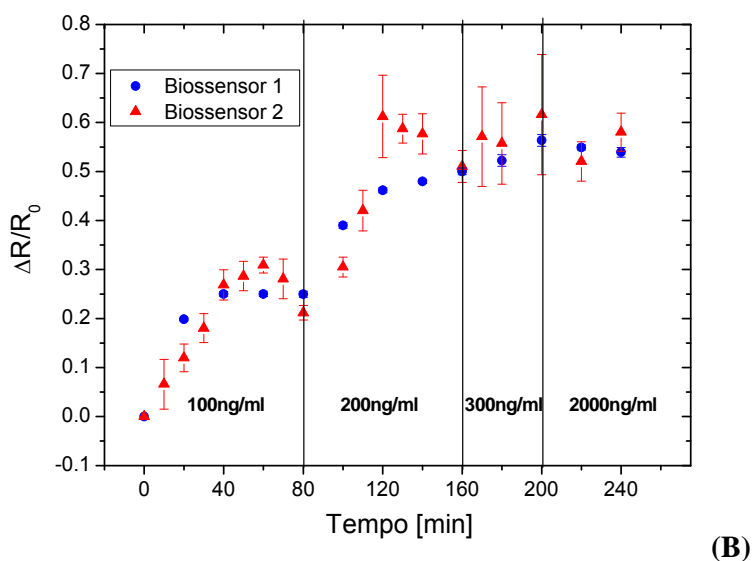
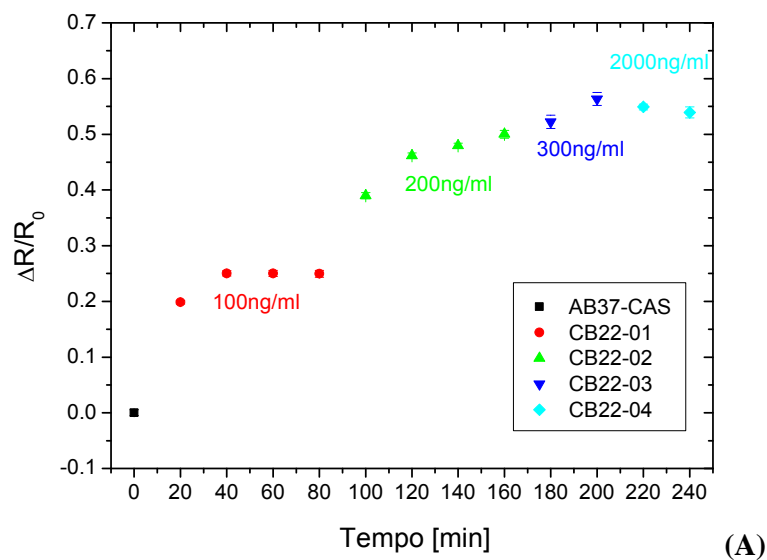


Figura 5.6: Gráfico da resistência do biossensor pelas etapas de medida. (A) *Biossensor 1*. Cada etapa representa a adição de antígeno na célula líquida; aumentamos a concentração de 100 em 100ng/ml com exceção da última etapa. (B) Comparação entre o *biossensor 1* e o 2.

A resposta do *biossensor 2* tende a acompanhar a do *biossensor 1*, principalmente ao final de cada etapa onde foi adicionado o antígeno. Note que grande parte dos pontos do *biossensor 2* possuem a barra de erro se sobrepondo aos pontos do *biossensor 1*, com exceção da concentração de 200ng/ml. Este mesmo tipo de resposta foi observado em outros três dispositivos teste (onde a concentração de anticorpos na superfície não havia sido otimizada); por este motivo, concluímos que o biossensor é reprodutível.

iii) Especificidade e sensibilidade do biossensor.

Fizemos uma modificação no processo de preparação do biossensor, trocando o anticorpo AB37 pelo anticorpo IgG (também fornecido pela profa Dagmar Machado) que não possui interação específica com o antígeno CB22. No ponto de vista de moléculas biológicas, estes dois anticorpos são muito semelhantes, possuindo a mesma massa molecular, ~150kDa, e o mesmo *pI*, ~ 6,7 (ponto isoelétrico: é o *pH* em que a molécula tem sua carga elétrica líquida nula). Portanto, para ambos anticorpos num meio com *pH* maior que o seu *pI* (como no caso do tampão PBS, *pH* 7,2), a soma da carga líquida tenderá a ser positiva, e por isso ambos terão influência semelhantes sobre o semicondutor caso estejam imobilizados na superfície. Isto torna possível a comparação entre o biossensor com o anticorpo AB37, com o IgG.

O gráfico da figura 5.7-A mostra a variação da resistência para o biossensor com anticorpo IgG, de 20 em 20 min variando a concentração de antígenos (conforme indicado no gráfico). Adotamos o tempo de 20min entre uma dose e outra de antígenos pois verificamos na seção anterior que o biossensor tem resposta de 2/3 do sinal neste tempo, o suficiente para verificar se está ocorrendo a reação.

O gráfico mostra que, à medida que a concentração de antígeno aumenta, ocorre uma pequena queda da resistência; em seguida observamos um aumento a partir de 750ng/ml até atingir uma variação de 5,5% numa concentração de 2000ng/ml. A variação se mantém nesta faixa (5,8%) para 5000ng/ml. A resposta do biossensor indica que há uma interação não específica com a superfície, tendo dois comportamentos distintos: um que causa a queda da resistência e o outro que a aumenta. Este fato não foi estudado com detalhes, pois nossa ênfase foi de demonstrar o funcionamento do biossensor. Porém uma análise mais detalhada deve ainda ser feita, inclusive verificando se para outras mudanças no sistema – trocando o antígeno ou o anticorpo para novos ensaios de especificidade – se este comportamento volta a se repetir.

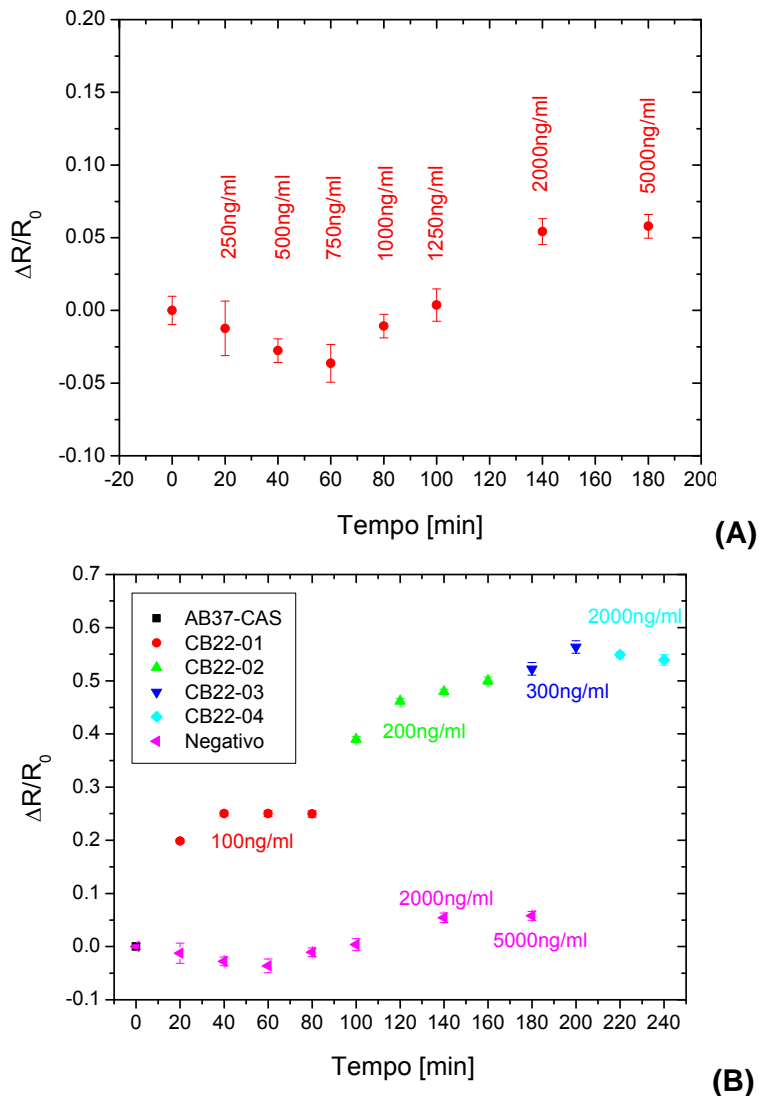


Figura 5.7: (A) Gráfico da variação da resistência pelo tempo para o biossensor com anticorpo IgG. (B) Comparação entre o gráfico (A), e o gráfico do *biossensor 1* (figura 5.6-A) em que se tem a interação do antígeno com o anticorpo específico.

O gráfico da figura 5.7B compara este biossensor com o *biossensor 1*, mostrado na figura 5.6-A. Note que existe uma clara diferença na resposta de uma interação específica (~55%), para uma não específica (~6%), mostrando que a especificidade deste dispositivo tem uma resposta quase dez vezes maior para um caso do que para o outro.

A partir deste resultado, pode-se definir um limite de sensibilidade deste biossensor, ou seja, para o qual concentração mínima de antígenos a resposta deste dispositivo é confiável. Pela especificidade, verificamos que a resposta tem que ser – pelo menos – maior do que 6% para que possamos identificar uma interação específica, enquanto o *biossensor 1* mostrou uma resposta de 25% para uma concentração de

100ng/ml. Com estes resultados pode-se dizer que a sensibilidade do biossensor é de pelo menos 100ng/ml, podendo em princípio chegar a um quarto deste valor.

5.8 Conclusão Parcial

Neste trabalho, desenvolvemos um biossensor resistivo tendo como substrato um semicondutor III-V, o InP. Estudamos como principais características deste dispositivo: a sensibilidade, a especificidade e o tempo de resposta.

O biossensor teve uma clara resposta com uma concentração de 100ng/ml de antígenos com anticorpos específicos, da ordem de 25%. Este valor é quatro vezes maior que a resposta no caso de antígenos interagindo com anticorpos não específicos, 6%, indicando confiabilidade da medida. O biossensor desenvolvido trabalha com uma sensibilidade de uma ordem de grandeza menor que o ELISA (2000ng/ml, para o mesmo sistema antígeno-anticorpo) ^[05], ensaio amplamente utilizado para este tipo de detecção (veja a seção 4.3). Uma vez que o nosso dispositivo possui uma saturação em 300ng/ml, pode-se dizer que este trabalha numa faixa de detecção diferente e de melhor sensibilidade do que o ELISA.

O fato do dispositivo possuir uma boa especificidade destaca que o procedimento bioquímico foi eficiente, e que os processos de funcionalização, imobilização e interação antígeno-anticorpo ocorrem como esperado, confirmando os resultados do ELISA e da espectroscopia de força apresentados no capítulo 4.

Quanto ao tempo de resposta, verificamos que 20min é suficiente para detectar 2/3 da resposta do sensor. Este tempo está dentro da média encontrada na literatura ^[06], pois a interação entre antígeno-anticorpo – a temperatura ambiente, 23°C – não ocorre instantaneamente dentro de uma solução, é necessário aguardar um tempo que varia de 20min a 2h para que a interação ocorra ^[06]. Em geral, a reação do biossensor é irreversível, pois interações específicas são dificilmente desfeitas. Logo este é um tipo de biossensor descartável; no máximo podemos limpar o substrato – conforme foi feito neste trabalho – e refazer todas as etapas químicas.

Mais um fato a ser destacado, é a facilidade na medição da resistência do biossensor, que não necessariamente necessita ser feita através de uma rampa corrente-tensão, bastando ter um voltímetro com precisão de nA (ordem da corrente que passa pelo dispositivo), para detectar a variação da resistência.

Este biossensor apresentou resultados confiáveis, despertando o nosso interesse por outros estudos neste tipo de plataforma, a fim de melhorar a sua sensibilidade e avaliar a sua eficiência no caso de outros tipos de materiais biológicos, tais como fragmentos de fitas de DNA e antígenos/anticorpos de *Xylella fastidiosa*. Além disso, o nosso grupo tem trabalhado em dispositivos baseados em nanofios de InP. Pretendemos verificar a viabilidade de construir um biossensor neste tipo de dispositivo.

5.9 Referências

- [01] Seker, F.; Meeker, K.; Kuech, T.F.; Ellis, A.B.; Chem. Rev. ; 100, 2505-2536 (2000)
- [02] Sze, S.M.; Kwok, K.; Physics of Semiconductor Devices; Wiley, Third Edition (2007)
- [03] Galup-Montoro C. & Schneider M.C. MOSFET modeling for circuit analysis and design. London/Singapore: World Scientific. pp. 83, (2007).
- [04] Talazac, L.; Sensor and Actuators B; 76, 258-264 (2001)
- [05] Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D. E.; Journal of Clinical Pathology, 31, 507-520 (1978)
- [06] Tlili, A.; Jarbouib, M.A.; Abdelghania, A.; Fathallahb, D.M.; Maaref, M.A.; Materials Science and Engineering; C 25, 490 – 495 (2005)

Capítulo 6

Pontas de AFM com nanotubos de carbono (CNTs)

6.1 Introdução

No AFM e em outros microscópios por varredura de sonda (*SPM – scanning probe microscopy*), a ponta é um componente crítico e limitante para a resolução das imagens. Pontas de *Si* e *Si₃N₄* são largamente utilizadas para esta técnica, as quais são de formato cônico ou piramidal. Elas possuem um raio típico de 5 a 15nm, com o ângulo do cone/pirâmide de 10 a 35° ^[01]. Em muitas aplicações, tais como o estudo de nanoestruturas e de macromoléculas biológicas isoladas, pontas com uma razão de aspecto maior e menor raio são necessárias.

Os nanotubos de carbono possuem propriedades singulares que podem ser exploradas para a fabricação de pontas para AFM ^[02,03,04,05,13]. O diâmetro de um nanotubo pode ser da ordem de nanômetros para o caso de *SWNTs (single-walled nanotubes)*, capaz de sondar pequenas moléculas biológicas ^[06,07], além de possuir uma geometria cilíndrica que favorece a alta razão de aspecto. O altíssimo módulo de Young – 1TPa ^[08] – faz com que ele tenha uma baixa vibração térmica proporcionando uma boa estabilidade para as medidas. Esta estabilidade ainda pode ser melhorada com adição de uma capa de carbono amorfo, conforme explicaremos mais adiante. O CNT pode dobrar e retornar ao seu estado inicial sem deformações ou desgastes, reduzindo danos na ponta e na amostra ^[04,09,10]. E, para o nosso interesse particular, ele pode ser quimicamente modificado em suas terminações para imagens funcionais de alta resolução. Atualmente existem várias rotinas de preparação para a fixação ou

crescimento do CNT na ponta de AFM ^[11,12], o que abre a possibilidade de estudos quantitativos de estabilidade e resolução de imagens para diferentes meios de medidas.

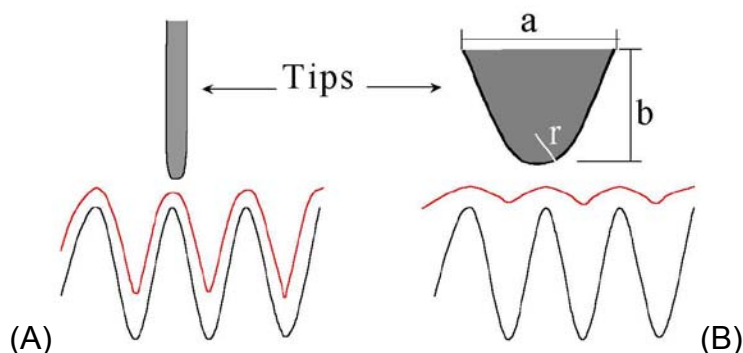


Figura 6.1: Pontas fazendo varredura em superfícies onduladas (linha preta), onde a linha vermelha mostra a soma conformacional da geometria da ponta com a amostra. (A) Ponta com alta razão de aspecto (comprimento/diâmetro) e (B) ponta com baixa razão de aspecto ^[05].

Medidas em meio líquido com pontas com CNTs já foram realizadas, inclusive com a sua extremidade já funcionalizada e imobilizada com moléculas biológicas ^[13,14]. A deformação elástica dos CNTs permite o aumento do reconhecimento molecular em medidas de força. Pontas com CNTs funcionalizados são mais eficientes do que um PEG (*Poliethyleneglycol*) – molécula normalmente utilizada como um espaçador entre a molécula biológica e a ponta – pelo fato do CNTs terem melhor controle orientacional das sondas moleculares reduzindo o seu grau de liberdade ^[14].

Em nosso grupo inicialmente trabalhamos com o método mais simples para a fabricação deste tipo de ponta que foi o proposto por Dai *et al* ^[15]. Este consiste na colagem de CNTs no extremo de uma ponta usando adesivos acrílicos ou através de forças químicas geradas por campo elétrico (quando a ponta de AFM é condutora). Estas pontas apresentavam aproveitamento muito baixo na fabricação, porém eram robustas e duravam algumas dezenas de imagens. A fim de melhorar o processo, passamos a montar pontas no LME/LNLS, em conjunto com o grupo do Dr. Daniel M. Ugarte. Os CNTs *multiwalled* foram colados em pontas de AFM com auxílio de um manipulador instalado no interior de um microscópio eletrônico FEG-SEM (modelo JEOL JSM 6330F). O feixe de elétrons foi focalizado na junção ponta-amostra, fazendo com que o carbono na atmosfera da câmara – propositalmente induzido – depositasse nesta junção promovendo a colagem entre estas ^[04,16,17]. Estas pontas, apesar do bom

aproveitamento na fabricação, eram bem mais frágeis que as produzidas anteriormente, e com algumas poucas imagens (ou às vezes uma única) o CNT se soltava da ponta [05]. Posteriormente, a matriz de carbono também foi utilizada para encobrir parte do CNT colado na ponta criando uma capsula que diminuía o comprimento do CNT (figura 6.2) e estabilizava mecanicamente a ponta. Publicamos na revista *Nano Letters* [04], em conjunto com o grupo do prof. Ugarte e do prof. Douglas S. Galvão, um trabalho que mostra que estas pontas reforçadas com a matriz de carbono apresentam maior estabilidade térmica e mecânica; simulações de dinâmica molecular mostram que a cápsula de carbono amorfo funciona como um amortecedor. Estas pontas tiveram uma durabilidade enorme de medidas – mais de 400 imagens – quando utilizadas para fazer imagens de uma amostra semicondutora de pontos quânticos.

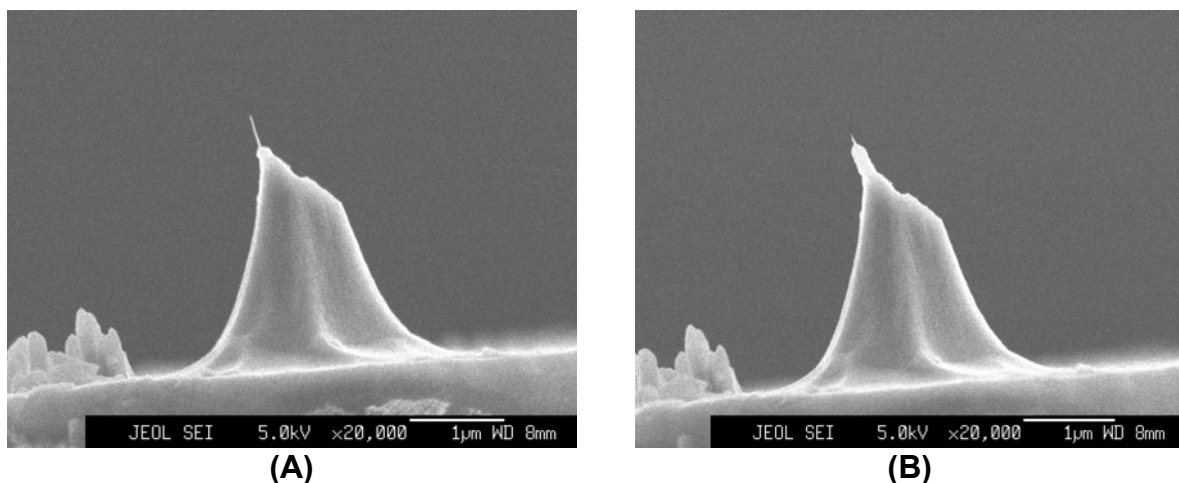


Figura 6.2: (A) Nanotubo apenas soldado na base da ponta, ponta N1-B. (B) Cápsula de carbono feita em torno do nanotubo N1-B.

Neste trabalho demos continuidade ao estudo de durabilidade/estabilidade das pontas de AFM com CNT e analisamos a qualidade das imagens topográficas. Tendo como perspectiva o uso desta pontas encapsuladas para medidas de força – seção 4.5 – estudamos a qualidade de imagens topográficas em água, pois a maioria das moléculas biológicas são ativas em soluções aquosas.

Juntamente com o estudo da ponta produzida no LME, estudamos uma ponta comercial da *Carbon Design Inovations* (CDI), empresa americana na qual estamos dando suporte para teste de produto. Embora a fabricação desta ponta tenha utilizado o princípio de encapsulamento desenvolvido pelo nosso grupo [04], ela possui

características diferentes da ponta produzida no LME, tais como diâmetro do CNT e o material de encapsulamento.

6.2 Metodologia

Utilizamos dois tipos de pontas com CNT, uma fabricada pelo nosso grupo em conjunto com o grupo do Prof. Daniel M. Ugarte ^[16], e a outra comercial, cedida pela empresa americana CDI (*Carbon Design Inovations*), que nos contatou para um teste de durabilidade similar ao que publicamos anteriormente ^[04].

Como padrão, utilizamos uma amostra semicondutora de pontos quânticos ordenados espacialmente, de InAs/GaAs/InP/InGaP, crescida pelo nosso grupo. Neste caso a separação entre os pontos quânticos na superfície é muito grande comparado com o raio da ponta, portanto a convolução afeta principalmente a dimensão lateral, porém não as alturas das medidas.

Analizamos imagens de $1 \times 1 \mu\text{m}$, onde variamos a frequência de varredura (número de linhas por segundo). Para diminuir o tempo de medida para as imagens feitas na análise de durabilidade, utilizamos uma frequência de 4 a 6Hz, enquanto para as imagens comparativas (tanto em líquido como em ar), utilizamos frequência de 0,1 a 1Hz. Esta frequência de varredura afetou a resolução de algumas imagens, como veremos mais adiante.

Utilizando o *software Gwyddion (freeware)*, observamos o espectro de potências bi-dimensional das imagens adquiridas, que permite uma análise quantitativa da resolução das imagens ^[05,18]. O espectro de potências depende do módulo da transformada de Fourier (FT), que por sua vez identifica as frequências espaciais presentes na imagem. Klapetek Petr et. al. ^[18] mostra teoricamente que a densidade do espectro de potência obtida por uma FT é influenciada pela dimensão do ápice da ponta. Desta forma, quanto maior a frequência observada, menor o comprimento de onda espacial associado, por isso melhor a resolução da ponta, vide figura 6.3-A.

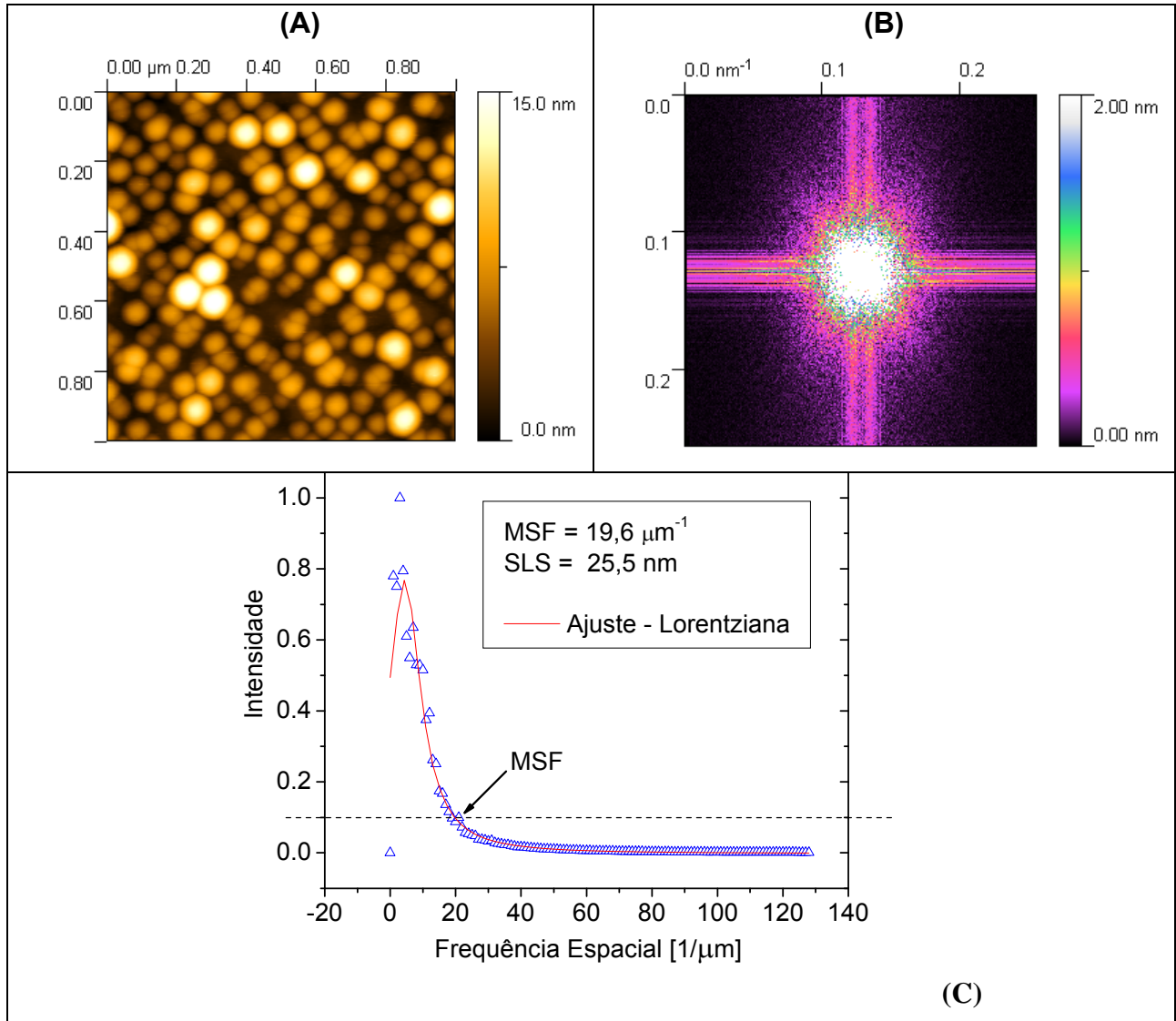


Figura 6.3: (A) Imagem topográfica da amostra semicondutora padrão de pontos quânticos. Foi utilizada uma ponta comercial de Si a μMash : NSC14. (B) Imagens da Transformada de Fourier (FT) Da imagem (A). (C) Espectro de Potência com o ajuste de uma curva de função Lorentziana (*LogNormal*) das imagens A e B. A linha tracejada indica quando a intensidade do espectro atinge 10% do seu total, lugar do qual será extraído o valor do MSF ^[16].

Normalizando o espectro de potência pela área do anel de integração, podemos quantificar a resolução lateral da ponta através de um critério de frequência espacial máxima (MSF – *maximum spatial frequency*) ^[05], para a qual o espectro de potências decai a 10% de sua intensidade máxima (100%). Com este critério, nós selecionamos as frequências correspondentes às estruturas da superfície, evitando o ruído de fundo. O menor tamanho lateral (SLS – *smallest lateral size*) que pode ser resolvido por uma

ponta, é dada pela relação $SLS = (2 \text{ MSF})^{-1}$ [18]. O gráfico da figura 6.3-B mostra o espectro de potência da imagem da figura 6.3-A. O valor de SLS para a ponta de Si é 25,5nm, indicando qual é a menor estrutura que esta ponta pode resolver.

Definimos um tratamento de imagem padrão para todas as imagens estudadas, a fim de não criar discrepâncias nos cálculos da MSF e SLS. Este tratamento consiste num nivelamento de primeira ordem para tirar o *background* de fundo, devido à inclinação da amostra, além de um nivelamento linha a linha em relação à mediana da imagem (para compensar a inclinação devido à varredura feita pelo *scanner*).

6.3 Resultados e Análise

Em trabalhos já desenvolvidos pelo nosso grupo, verificamos que a resolução adquirida por uma ponta com CNT é maior do que para uma ponta comercial de Si ou Si_3N_4 [05,16]. Repetimos o mesmo procedimento e fizemos uma comparação – utilizando ferramentas espectrais – da resolução de duas pontas com CNT, N3B (fabricada pelo nosso grupo) e a CDI (comercial), com uma ponta comercial convencional de Si – NSC14-*Mikromash*.

A figura 6.4 mostra imagens da amostra padrão feitas pelas três pontas descritas acima (figuras A, B e C) em regiões diferentes da amostra (a troca da ponta implica na perda de referência espacial na escala micrométrica). Na figura 6.4-D temos um gráfico típico do espectro de potência para as três imagens.

Através de uma análise qualitativa das imagens, nota-se uma nítida melhora na resolução das imagens feitas com as pontas CNT, N3B e CDI, em relação à NSC14, onde em particular a N3B apresenta melhor resolução. Esta análise é confirmada pelos valores de SLS calculados pelo gráfico da densidade de espectro de potência, em que a ponta N3B conseguiu detectar a menor dimensão lateral, 16,3nm, em relação a 20,3nm para a CDI e 25,5nm para a NSC14. Isto é um indicativo que as pontas com CNT possuem uma razão de aspecto (razão entre o comprimento da ponta e o seu diâmetro) maior que a ponta NSC14, o que está diretamente associado com a qualidade da imagem que esta ponta será capaz de adquirir. A ponta estreita e cilíndrica proporcionada pelo CNT é responsável pela menor convolução geométrica

com a estrutura de interesse na superfície da amostra ^[19], conforme é ilustrado na figura 6.1.

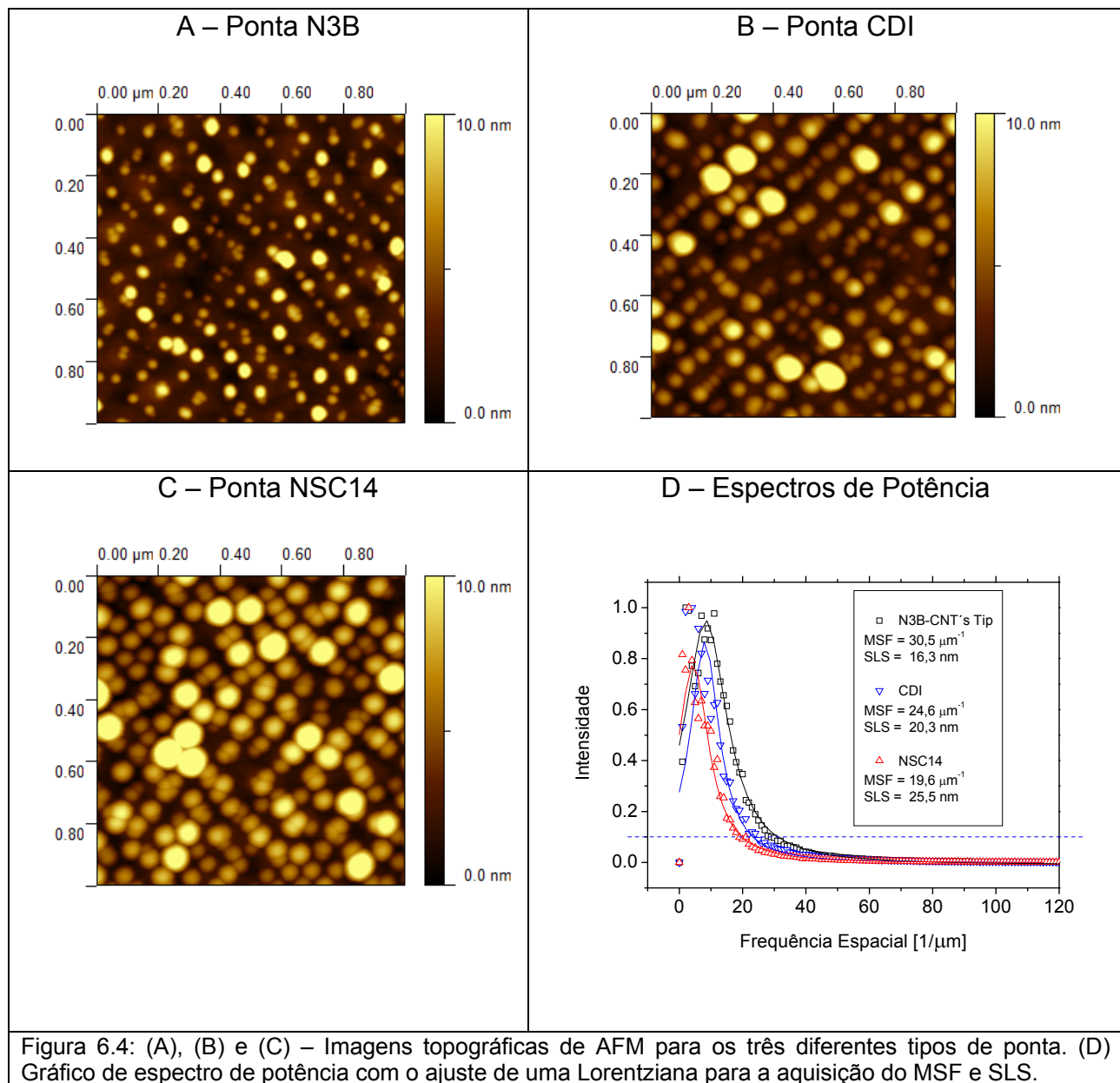


Figura 6.4: (A), (B) e (C) – Imagens topográficas de AFM para os três diferentes tipos de ponta. (D) Gráfico de espectro de potência com o ajuste de uma Lorentziana para a aquisição do MSF e SLS.

Na figura 6.7-A e 6.7-C temos imagens de microscopia eletrônica de varredura destas duas pontas com CNT; nestas imagens fica claro que a razão de aspecto da ponta N3B é maior que a CDI, o que favorece a melhor resolução de imagens da primeira. Através destas imagens estima-se que a ponta N3B tem um diâmetro de ~

10nm, enquanto a CDI ~ 20nm, um fator a mais que favorece a melhor resolução da ponta N3B.

Naturalmente, é possível adquirir imagens com melhor resolução usando pontas NSC14. Porém estes casos são mais raros; o processo de fabricação destas pontas não proporciona resultados uniformes, e para isto temos que testar várias pontas até encontrar uma com razão de aspecto um pouco mais alta que a média. A imagem que mostramos na figura 6.4 C é um caso típico para este tipo de ponta.

Para verificar a influência de diferentes regiões da amostra nos valores de SLS, fizemos uma análise do valor do SLS para cinco diferentes regiões da amostra utilizando uma ponta comercial NSC14. Encontramos uma média de 29 ± 1 nm, onde o erro demonstra a influência da amostra no valor de SLS. Como veremos mais adiante, os erros encontrados para diferentes imagens feitas numa mesma região da amostra é de até ± 0.5 nm, ou seja, metade do erro para diferentes regiões. Este fator tem que ser levado em consideração quando comparamos o valor do SLS de diferentes pontas feitas em diferentes regiões. Porém note que para a análise feita acima, mesmo se considerarmos o erro do SLS de ± 1 nm, ou seja:

$$SLS_{N3B} = 16 \pm 1 \text{ nm}$$

$$SLS_{CDI} = 20 \pm 1 \text{ nm}$$

$$SLS_{NSC14} = 26 \pm 1 \text{ nm}$$

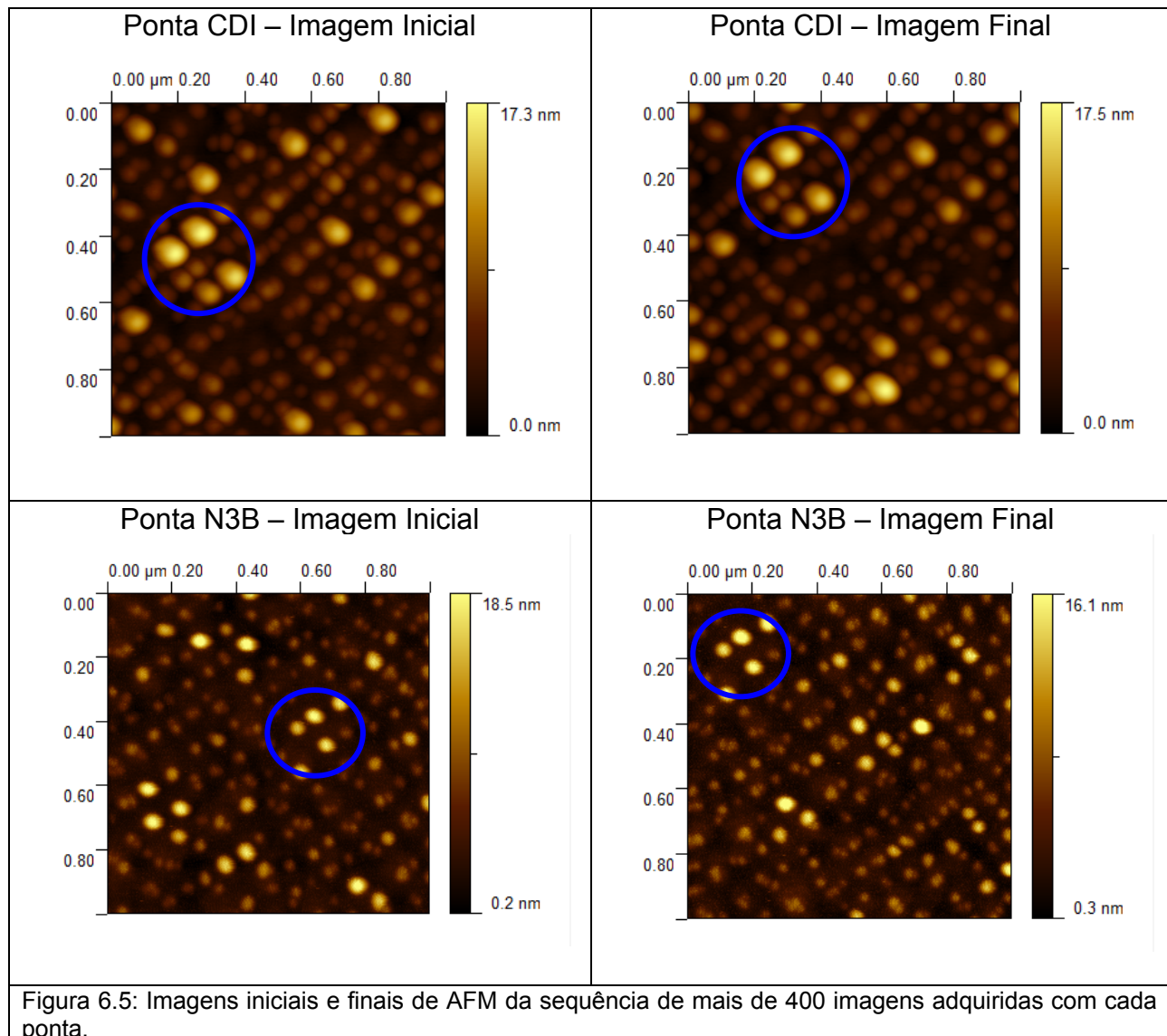
os valores encontrados não irão se sobrepor, e desta forma a ponta N3B continua tendo a melhor resolução, seguida pelas pontas CDI e NSC14. Logo, mesmo com este erro, as nossas conclusões anteriores continuam válidas.

6.4 Durabilidade das Pontas com CNT

Os CNTs são populares por serem extremamente resistentes a desgastes mecânicos^[10]; sua ruptura sob tração é da ordem de 200 GPa, 100 vezes superior ao mais resistente aço^[08]. Estas propriedades mecânicas são de grande utilidade para

pontas de AFM, uma vez que o seu desgaste e quebra são problemas constantes durante a sua utilização.

Desta forma, estudamos a durabilidade das pontas de AFM com CNT para as duas pontas que tínhamos à disposição: a N3B e a CDI. Para ambas pontas fizemos uma sequência de mais de 400 imagens de uma mesma região da amostra, apenas variando ligeiramente alguns parâmetros do sistema para manter o microscópio adquirindo imagens continuamente pelo período de várias horas.



Na figura 6.5 temos as imagens iniciais e finais para as pontas N3B e CDI. Qualitativamente, é imperceptível se há perda de resolução entre as imagens de uma mesma ponta, mas novamente nota-se que a ponta N3B possui melhor resolução que a

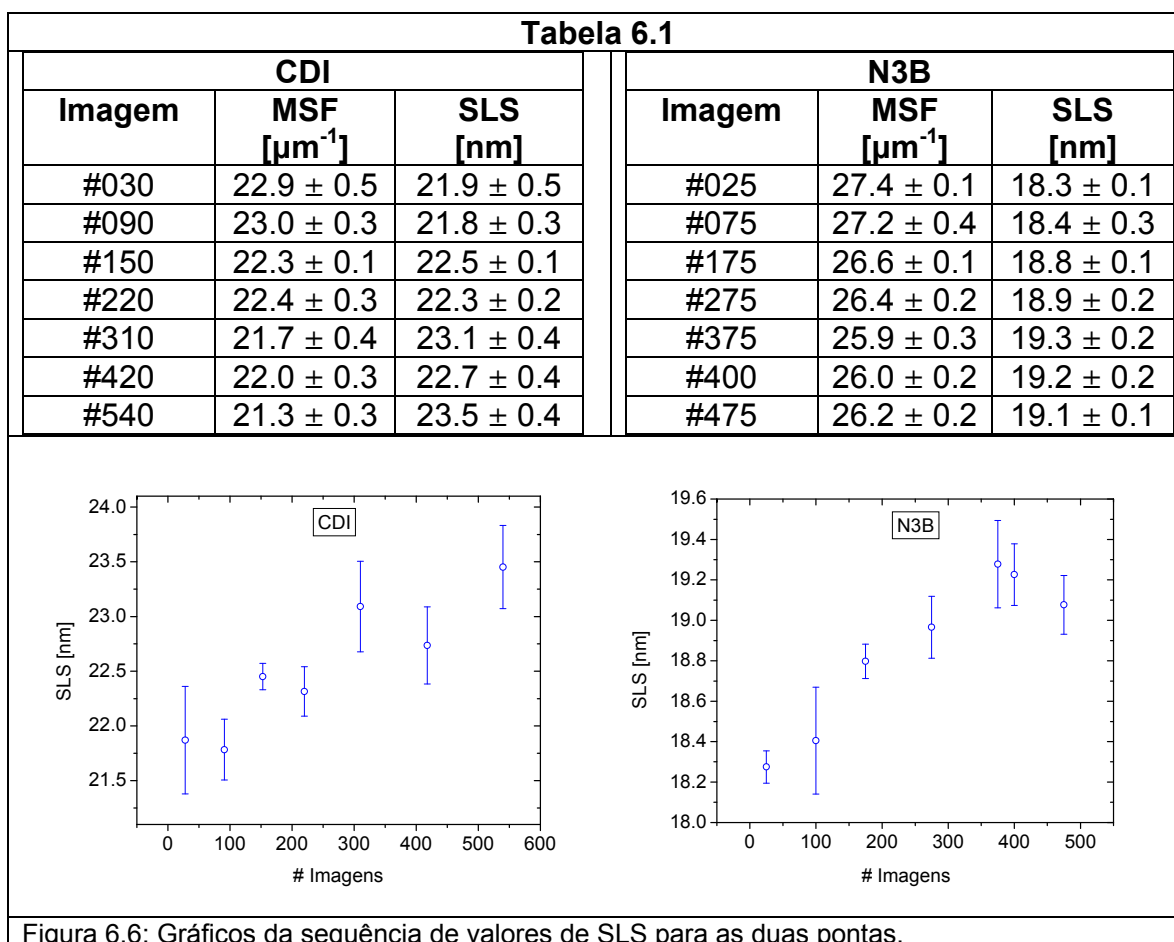
CDI. Ao longo das imagens, houve um pequeno deslocamento do *scanner* provavelmente devido a histerese do mesmo, mas repare que trata-se da mesma região da amostra (círculo azul).

A tabela 6.1 mostra o cálculo de MSF e SLS ao longo da aquisição das imagens, em intervalos que variaram de 25 a 120 imagens. O erro foi calculado pela média de 6 imagens. Podemos acompanhar como foi a evolução da resolução das pontas. Para ambas pontas, o valor de SLS aumentou ao longo das medidas. A tabela 6.1 é melhor visualizada pelos gráficos da figura 6.6.

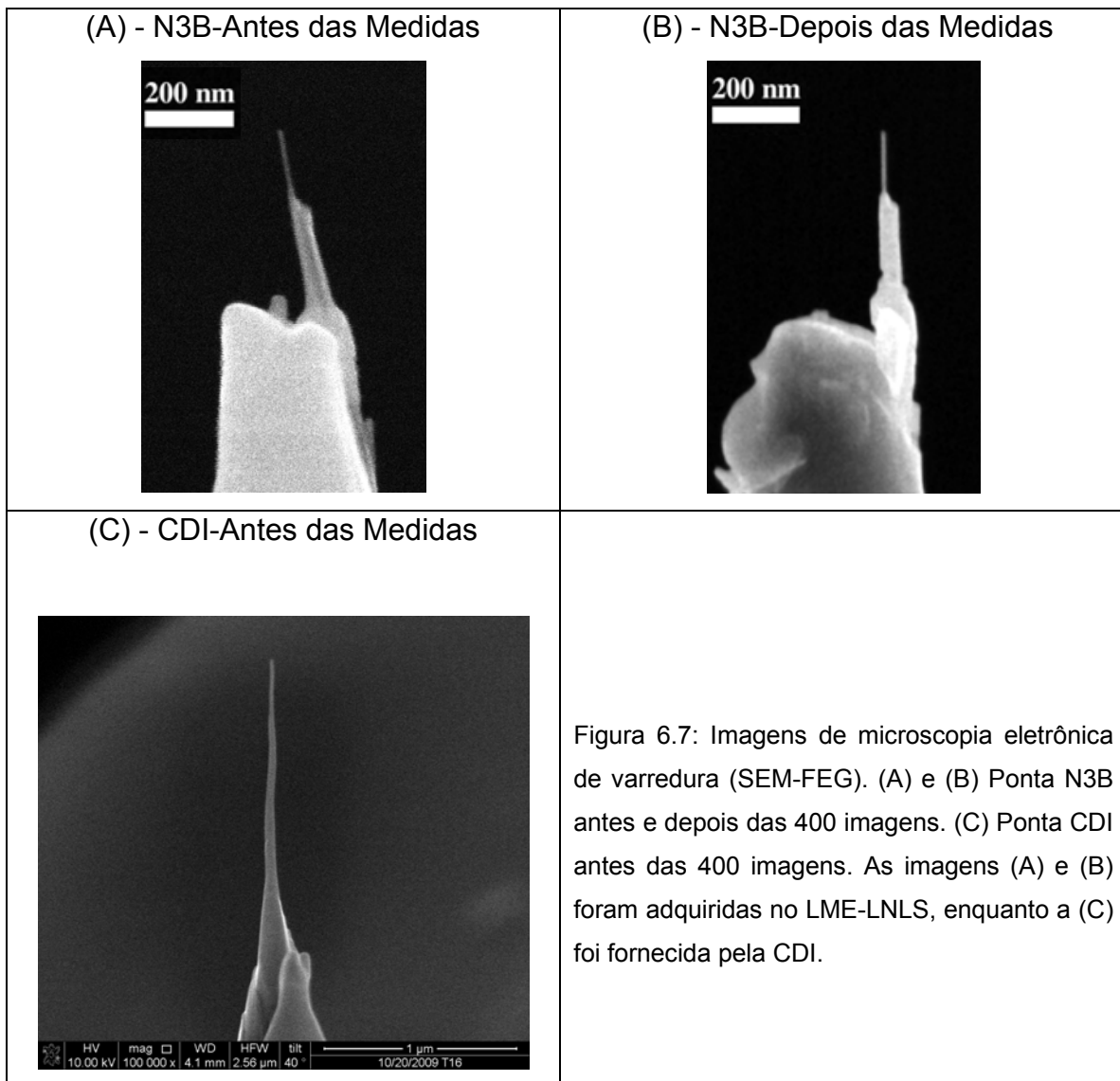
O aumento gradual do SLS para ambas pontas é um indício que estas estão sofrendo algum tipo de desgaste ao longo das medidas. Esta variação chegou a 1,5nm para a ponta CDI e 1 nm para a ponta N3B, ou seja, ~ 7% e 5% do valor de SLS respectivamente. A princípio esperávamos que pelo fato do CNT ser cilíndrico, mesmo que houvesse algum desgaste da ponta, a resolução da imagem iria se manter.

Em contato com a empresa CDI, soubemos que estas pontas foram geradas ainda na fase de otimização do processo de fabricação; assim é possível que exista uma pequena camada de óxido recobrando o CNT, tornando o perfil da ponta levemente cônico; neste caso, o desgaste da ponta deveria afetar a resolução. Esta suposição é confirmada pela imagem da figura 6.7 C, em que nota-se o perfil cônico da ponta.

Nas figuras 6.7-A e 6.7-B podemos comparar se houve desgaste na ponta N3B antes e depois das medidas. É possível estimar que o comprimento do CNT se manteve praticamente o mesmo antes e depois das medidas, ~ 170 nm. Por estas mesmas imagens notamos que a solda de carbono amorfo mostra-se danificada, indicando que esta é a parte mais sensível da ponta. É possível que a variação do SLS esteja associada ao dano da solda de carbono, e que esta parou de ser danificada por volta da imagem 375. Isto porque o gráfico da figura 6.6 (N3B) indica que o SLS parou de aumentar em torno desta medida, e que a partir desta o SLS possivelmente se manteve estável (devido ao erro não é possível afirmar esta estabilidade). Como veremos mais adiante, mesmo com a solda danificada, a ponta ainda estava funcional para as medidas em meio líquido.



Para efeito de comparação, um teste de durabilidade foi realizado com uma ponta comercial NSC14 para uma sequência de 100 imagens. Observou-se que o valor de SLS aumentou de $26,4 \pm 0.1$ para 29 ± 1 nm das primeiras para as últimas imagens. Isto demonstra o maior desgaste da ponta de Si, pois houve um aumento de quase 10% do SLS ao longo das medidas. Em comparação, a ponta com CNT CDI mostrou um aumento de $\sim 7\%$ ao longo de mais de 400 medidas. Isto ajuda a destacar a durabilidade destas últimas.



Os valores de SLS para imagens da ponta N3B estão um pouco maiores caso comparados com as medidas anteriores, mostradas na figura 6.4A, 16,1nm. Esta piora da resolução foi devido à alta frequência de varredura que utilizamos (~4Hz) para o estudo da durabilidade da ponta. Esta frequência causa ruídos na imagem – possivelmente choques da ponta com a amostra – que normalmente são evitados quando feitas em baixa frequência, menor que 1Hz, e isto afetou nos valores de SLS. O mesmo não foi observado para a ponta CDI pois, para as medidas neste caso, diminuimos a frequência em 1Hz em intervalos de 50 em 50 imagens para o estudo das imagens.

6.5 Medidas em meio líquido

Um dos grandes interesses de nosso grupo é testar a estabilidade das pontas com CNT em meio líquido, pois neste meio teremos a possibilidade de utilizar estas pontas para uma gama maior de materiais biológicos do que em ambiente seco.

Realizamos medidas em água DI para ambas pontas CDI e N3B. A figura 6.8 mostra imagens onde é possível comparar a resolução das imagens antes, durante e depois das medidas em água.

Analisando as imagens, percebe-se que houve uma perda de resolução para as medidas feitas em água, como era de se esperar, e ao retornar para as medidas a seco, aparentemente as pontas não retornaram à sua resolução inicial.

Os valores de SLS também confirmam este fato (tabela 6.2). Para ambas as pontas há um pequeno aumento do SLS para as medidas em água; os valores voltam a diminuir novamente para as medidas a seco. Para as pontas N3B este aumento foi de 5.3%, enquanto para a ponta CDI este foi de 2.8%, o que indica que a resolução da ponta N3B piorou mais do que a ponta CDI e que por isso o aumento da viscosidade do fluido do meio – no caso do ar para a água – afeta mais um nanotubo mais fino e flexível como o N3B, do que um nanotubo mais robusto (ou recoberto por fina camada de óxido) como o CDI (figuras 6.7-A e 6.7-C).

Tabela 6.2

	N3B	CDI
	SLS	SLS
Seco	16,9 ± 0.2	21,5 ± 0.2
Água	17,8 ± 0.4	22,1 ± 0.4
Seco Pós-Água	17,4 ± 0.2	20,4 ± 0.4

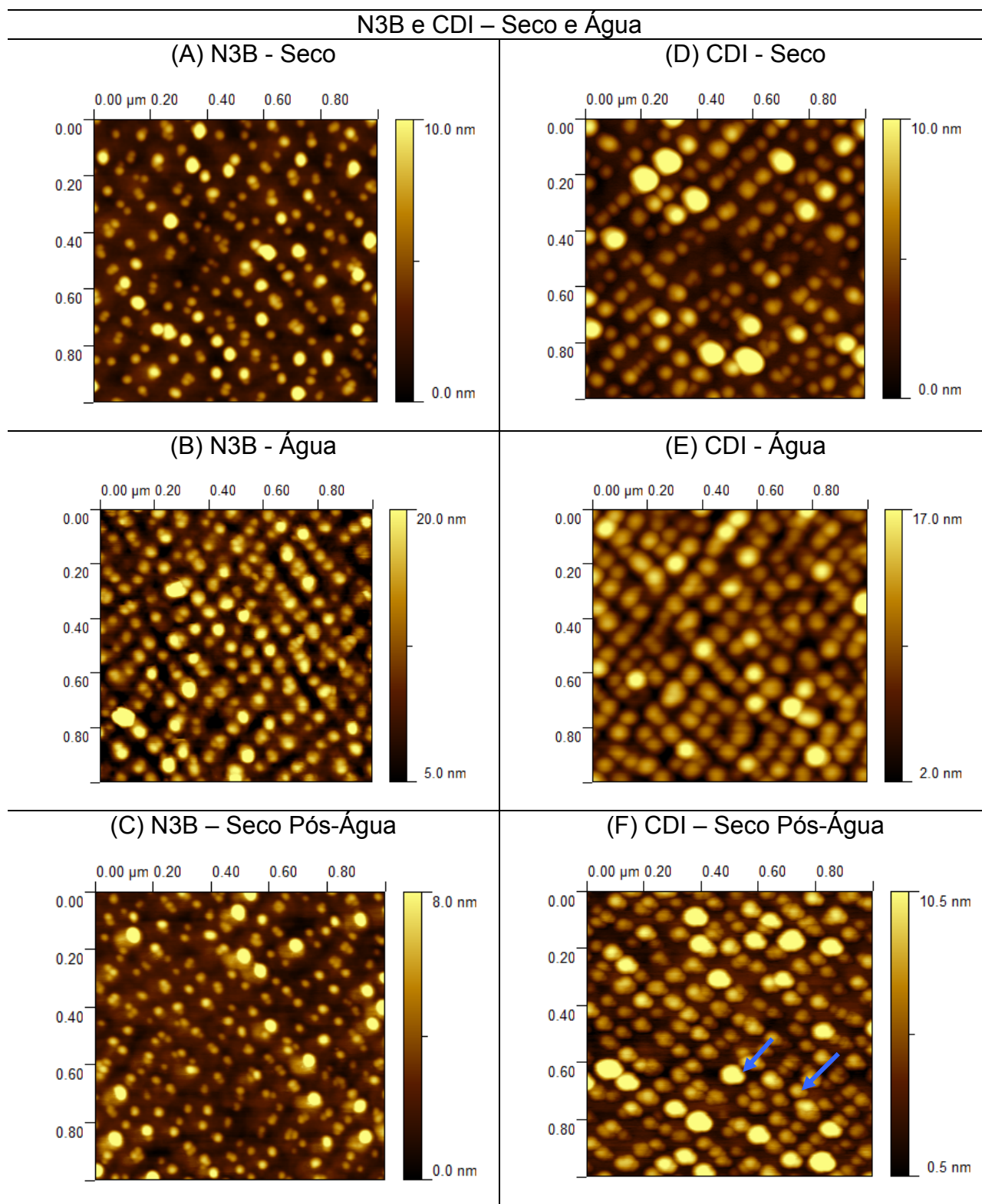


Figura 6.8: Imagens de AFM adquiridas com as pontas N3B e CDI. (A) e (D) Medidas a seco; (B) e (E) Medidas em água; (C) e (F) Medidas a seco pós-água.

O fato do valor de SLS para as medidas “seco pós-água” não ter retornado a um valor similar às medidas a seco (ou menor) para a ponta N3B indica que é provável que esta ponta sofreu danos após a medida, e que pode haver algum resíduo aderido ao CNT.

A imagem de AFM com a ponta CDI pós-água (figura 6.8-F) mostra claramente que existe uma quebra ou um resíduo aderido na ponta pois para todos os pontos quânticos varridos na imagem há um perfil semelhante no lado superior esquerdo (seta azul).

6.6 Conclusão Parcial

Ambas as pontas com CNT encapsulado demonstraram ter grande resistência para um número de medidas substancialmente maior que o comumente observado para pontas de Si, além de se mostrarem viáveis para medidas em líquido. Pelo que nossos resultados indicam, a ponta N3B obteve imagens com maior resolução – tanto em ambiente seco, quanto em água – embora tenha mostrado ter maior perda relativa de resolução quando medida em água comparado com a ponta CDI. Isto se deve ao fato da ponta N3B ter um CNT com menor diâmetro, ou seja, existe uma relação entre resolução e estabilidade das medidas que deve ser levada em consideração quando se usa pontas com CNT.

Ainda há a possibilidade de aumentar o encapsulamento da ponta com CNT para as medidas em líquido, aumentando assim a sua estabilidade neste meio.

A durabilidade excepcional das pontas mantendo a resolução tem uma grande vantagem. Como a ponta tem pouca variação da resolução ao longo das medidas, ela pode ser usada para medir diversas amostras mantendo a mesma resolução das imagens, ou seja, a soma conformacional da geometria da ponta será a mesma para todas as imagens, facilitando o estudo comparativo das imagens.

6.7 Referências

- [01] http://www.spmtips.com/spm_probes/
- [02] (4) Noy, A.; Vezenov, D. V.; Lieber, C. M. Annu. Rev. Mater. Sci., 27, 381-421, (1997).
- [03] <http://www.veeco.com>
- [04] Nakabayashi, D.; Moreau, A. L. D.; Coluci, V. R.; Galvão, D. S.; Cotta, M. A.; Ugarte, D.; Nano Lett.; Vol. 8, No. 3, (2008).
- [05] Gutiérrez, H. R.; Nakabayashi, D.; Silva, P. C.; Bortoleto, J. R. R.; Rodrigues, V.; Clerici, J. H.; Cotta, M. A.; Ugarte, D.; Phys. Stat. Sol.; 201, No. 5, 888–893 (2004).
- [06] Qin, L.C.; Zhao, X.; Hirahara, K.; Miyamoto, Y.; Andos, Y.; Iijima, S.; Nature, 408, 50 (2000).
- [07] Wang, N.; Tang, Z. K.; Li, G. D.; Chen, J. S. Nature, 408, 50-51 (2000).
- [08] Salvétat, J. P.; Bonard J. M.; Thomson, N. H.; Kulik, A. J.; Forro, L.; Benoit, W.; Zuppiroli, L.; Appl. Phys. A 69, 255–260 (1999).
- [09] Dai, H. J.; Hafner, J. H.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E.; Nature, 384, 147-150 (1996).
- [10] Iijima, S.; Brabec, C.; Maiti, A.; Bernholc, J.; J. Chem. Phys., 104, 2089-2092. (1996).
- [11] Hafner, J. H.; Cheung, C. L.; Lieber, C. M. J. Am. Chem. Soc., 121, 9750-9751 (1999).
- [12] Yenilmez, E.; Wang, Q.; Chen, R. J.; Wang, D. W.; Dai, H. J. Appl. Phys. Lett., 80, 2225-2227 (2002).
- [13] Stanislaus S. Wong, Ernesto Joselevich, Adam T. Woolley, Chin Li Cheung & Charles M. Lieber; NATURE |VOL 394 | 2; 52-55 (1998)
- [14] Stanislaus S. Wong 1, Adam T. Woolley 2, Ernesto Joselevich, Charles M. Lieber; Chemical Physics Letters 306 ; 219–225 (1999)
- [15] Nguyen, C. V.; Chao, K. J.; Stevens, R. M. D.; Delzeit, L.; Cassell, A.; Han, J.; Meyyappan, M.; Nanotechnology 12, 363 (2001)
- [16] Moreau, A. L. D.; “*Processamento e Funcionalização de Pontas Para Aplicações Biológicas de Microscopia de Força Atômica*”; Tese de Mestrado apresentada no Instituto de Física Gleb Wataghin da Unicamp (2003)
- [17] Akama, Y.; Nishimura, E.; Sakai, A.; Murakami, H. J. Vac.; Sci. Technol. 8, 429 (1990)
- [18] Klapetek P.; Ohlídal I.; Ultramicroscopy 94, 19 (2003)
- [19] Villarrubia J. S.; J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol; 102, 425 (1997)

Capítulo 7

Conclusões Gerais

Ao longo deste trabalho, apresentamos o uso da microscopia de força atômica aplicada a materiais biológicos, o desenvolvimento de um biossensor semicondutor e o estudo da estabilidade de uma sonda de AFM com CNT em meio líquido. Iremos apresentar um breve apanhado dos resultados comentando as suas aplicações e perspectivas.

O estudo da formação de biofilmes de *Xylella fastidiosa* por imagens de AFM e de microscopia óptica mostrou que para diferentes fases do biofilme num ambiente sem a reposição de nutrientes, as bactérias se organizam de forma diferente, tendo uma organização compacta para as fases iniciais e finais, e uma estrutura de ramos na fase de maturação. Com as leis de escala, pudemos associar dois modelos de crescimento ao sistema, o modelo de Eden para as fases compactas (início e fim) e o DLA para as fases de formação de ramos (maturação). Todas estas mudanças puderam ser associadas a basicamente dois fatores do sistema: a formação da matriz polimérica de EPS e à escassez de nutrientes. Desta forma, pudemos verificar que com o estudo de uma pequena parcela da superfície do biofilme (imagens de AFM) identificamos estágios da colônia como um todo (maturação e degradação). Isto indica que mesmo que o AFM seja limitado para estudar um biofilme como um todo – pode chegar a diâmetros de 400µm, portanto visível a olho nu – ele ainda é uma ferramenta útil e pode trazer contribuições importantes a partir do estudo de pequenas regiões da superfície de biofilmes. Este trabalho foi publicado no *Journal of Applied Physics* em agosto de 2009 ^[01].

Ainda com o AFM, usamos a espectroscopia de força para estudar a interação antígenos-anticorpos obtidos através do vírus CTV. Verificamos que há uma queda de ~60% da força quando é trocada a interação específica antígeno-anticorpo pela não

específica antígeno-antígeno, mostrando que existem populações de antígenos e anticorpos imobilizados nas superfícies e que estes estão biologicamente ativos. Este sistema foi montado em cima de substratos tanto de Si quanto de InP, e verificamos que ambos possuem comportamentos semelhantes à resposta da força. Este fato demonstra que o procedimento simples adotado para a funcionalização e imobilização de material nas superfícies da ponta e amostra está sendo eficiente para as medidas de força. Dentre as aplicações deste sistema, destacamos o mapeamento de sítios em superfícies que possuem afinidade com o material imobilizado na ponta, tornando possível, inclusive, o mapeamento do vírus CTV identificando regiões de ligações específicas e não específicas, um dos princípios de um nanobiossensor. Este estudo também viabilizou o desenvolvimento dos biossensores em InP, que foi um dos substratos utilizados.

Já os biossensores desenvolvidos em substratos de InP mostraram-se viáveis respondendo claramente ao material analisado. Estes dispositivos, preparados com o mesmo sistema biológico antígeno-anticorpo mostrado na espectroscopia de força, mostraram ter uma variação relativa de resistência de ~55% quando interagiam com o antígeno específico do sistema, enquanto para as interações não específicas esta variação era de ~6%. Ou seja, ele mostrou uma clara especificidade ao par antígeno-anticorpo que desejávamos detectar. Este foi o primeiro protocolo para caracterizar a especificidade do biossensor. Naturalmente, existem inúmeras substâncias que precisam ser caracterizadas no biossensor, uma vez que a seiva da planta – de onde é retirado o vírus – é formada por vários componentes como a glicose e resíduos de outros microrganismos. A sua sensibilidade é de, no mínimo, 100ng/ml de antígeno, uma ordem de grandeza menor caso comparado com ensaios de ELISA com o mesmo sistema biológico. Acreditamos que com algumas melhorias no processo de preparação, esta sensibilidade seja ainda menor. Este dispositivo também é atrativo pela simplicidade da eletrônica necessária para detectar a sua resistência.

Há perspectivas de desenvolver este biossensor em dois novos substratos: o de SiN_x utilizando a mesma rotina de preparação, com a vantagem de ser um substrato mais barato e mecanicamente resistente para manipulação – porém com

instrumentação de medida mais complicada por se tratar de um dielétrico; e num nanofio de InP, que pode proporcionar sensibilidade muito alta ^[02].

Os resultados obtidos pelo ELISA, uma técnica convencional para detectar este tipo de interação, confirmam a validade dos resultados obtidos na espectroscopia de força e biossensores. E também para estas duas técnicas, podemos estudar outros sistemas biológicos, como fitas de DNA ou então outros pares antígenos-anticorpo como por exemplo os da *X. fastidiosa*.

Vale destacar que os sistemas biológicos estudados nesta tese (CTV e *X. fastidiosa*) são grandes pragas para a agricultura de citros no Brasil, e que todos os resultados obtidos são informações que serão usadas para detectar e estudar estes sistemas fitopatológicos. Dentre as várias vantagens destes sistemas, podemos destacar o fato de não serem patogênicos para os seres humanos – e com isso poderem ser utilizados em ambiente de laboratório convencional. Além disso, no caso da *X. fastidiosa* temos uma bactéria que cresce de forma lenta – por isso o nome *fastidiosa* – viabilizando o estudo em função do tempo *in-vitro* com AFM e fluorescência.

Por fim as pontas de AFM com CNTs encapsulados se mostraram extremamente resistentes além de estáveis em meio líquido, o que viabiliza o seu uso para aplicações biológicas. Tanto a ponta comercial CDI, quanto a ponta montada pelo nosso grupo mostraram uma leve perda na resolução, de 3 a 5%, quando usadas em líquido. Os CNTs também podem ser funcionalizados para a imobilização de material biológico, e pode ser usado para medidas de espectroscopia de força com a vantagem de possuir melhor resolução espacial ^[03].

Referências

[01] Moreau, A. L. D.; Lorite, G. S.; Rodrigues, C. M.; Souza, A. A.; Cotta, M. A.; Journal of Applied Physics; 106, 024702, (2009).

[02] Gao X. P. A. ; Zheng, G.; P. D.; Lieber, C. M.; Nano Lett., 10, 547-552 (2010).

[03] Chen, L.; Cheung, C. L.; Ashby, P. D.; Lieber, C. M.; Nano Lett., 4, 9, (2004).

Apêndice 1

Calibração da constante de mola das alavancas

Cada alavanca de AFM possui uma constante de mola (k) característica que depende da sua geometria, massa, constante de elasticidade e o meio em que a medida foi feita ^[01]. Em geral o fabricante das pontas fornece o valor de k dentro de uma grande faixa de erro, variando em até 70% (em ar). É possível comprar pontas já previamente calibradas em ar ou água. Porém, além de nossas medidas serem realizadas em um meio específico (tampão PBS), ainda aderimos reagentes químicos e material biológico na alavanca, o que muda a sua massa e contribui ainda mais para a mudança da constante de mola.

Como a espectroscopia de força depende diretamente desta constante (capítulo 4), é de grande importância que esta esteja calibrada corretamente.

Dentre as diversas técnicas de calibração existentes, optamos por aquela que utiliza a flutuação térmica como parâmetro de calibração da alavanca. Dentre várias vantagens, esta técnica não depende de parâmetros geométricos nem tampouco da massa da alavanca ^[01]. Além disso o *software* do nosso microscópio tem como ferramenta este tipo de calibração. Desta forma a constante de mola foi calibrada utilizando o princípio de equipartição de energia, onde a flutuação térmica da alavanca pela frequência de oscilação representa um grau de liberdade de seu movimento. Hutter e Bechhoefer ^[2] desenvolveram um método em que, partindo da Hamiltoniana de um oscilador em equilíbrio térmico com o meio, permite calcular a constante de mola pela equação:

$$k = \frac{k_B T}{P} \quad (\text{A.1})$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em Kelvin, e P é a área do espectro de potência da flutuação térmica. Este espectro é adquirido por uma placa da *National Instruments*, controlada pelo software *Picoview*, que também controla o microscópio AFM-

5500 da *Agilent*. A figura A.1 mostra os gráficos adquiridos pelo *Picoview*, juntamente com o cálculo da constante de mola pela equação A.1. Devido às vibrações mecânicas e a precisão dos sensores ópticos, o erro desta constante de mola está em torno de 20%^[1].

Utilizamos para as nossas medidas pontas tipo *Microlever UL06* da *Thermomicroscopes (atual Veeco)*, alavanca E, cuja constante de mola (dado do fabricante) é de 0.1N/m (em ar). Em geral encontramos valores um pouco maiores do que este, em torno de 0.11N/m, o que era de se esperar pois tanto o meio de PBS quanto o material aderido à ponta favorecem o aumento de k. Note que este pequeno aumento da constante de mola ainda está dentro do limite de erro dado pelo fabricante do AFM.

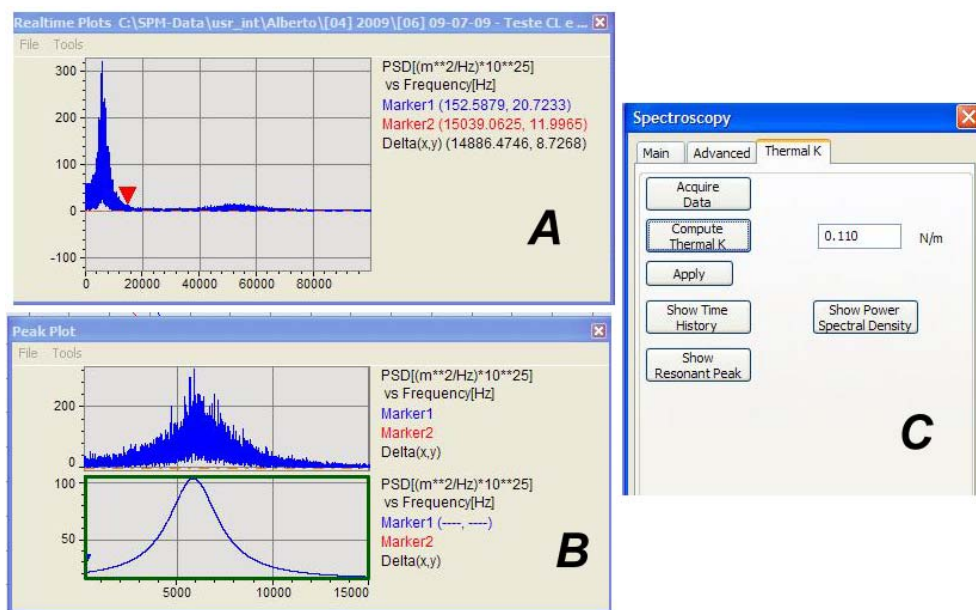


Figura A.1: (A) Espectro da flutuação térmica variando a frequência de 0 a 100kHz. (B) Ampliação do pico de ressonância, onde abaixo há uma curva gaussiana ajustada para o cálculo da área. (C) Valor da constante de mola, 0.11N/m.

Uma vez calibradas as alavancas, as constantes de mola foram utilizadas para o cálculo das forças adquiridas pelo AFM, permitindo a comparação das medidas feitas com diferentes pontas, conforme foi feito no capítulo 4 desta tese.

Referências

- [01] N.A.Burnham et. al, Nanotechnology 14, 1–6 (2003)
- [02] Jeffrey L. Hutter and John Bechhoefer, Rev. Sci. Instrum. 64 (7), (1993)

Lista de Publicações

A- Artigos publicados:

Moreau, A.L.D.; Simone, L.G.; Rodrigues C.M.; Souza A.P.; Cotta, M.A.; Journal of Applied Physics.; v.106, p.106 (2009).

Nakabayashi, D.B.; Moreau, A.L.D.; Coluci, V.R.; Galvão, D.S.; Cotta, M.A.; Ugarte, D.M.; Nano Letters. , v.8, p.842 - 847, (2008).

Moshkalyov, S.S.; Moreau, A.L.D.; Gutiérrez, H.R.; COTTA, M.A.; Swart, J.W.; Materials Science and Engineering. B, Solid State Materials for Advanced Technology. , v.112, p.147 - 153, (2004).

B- Artigos em processo de submissão:

Study of DNA fragmentation by gamma radiation and electron beams using Atomic Force Microscopy; Arruda-Neto, L. Nieto; Cotta, M. A.; Carrer, H.; Garcia, F.; Silva, R.A.S.; Moreau, A. L. D.; Biophysical Journal; (aguardando resposta do editor)

C- Artigos em preparação relacionados à tese:

Biosensor prototype based on InP epitaxial layers; Moreau, A.L.D.; Peroni, L.A.; Stach-Machado, D.R.; Cotta, M.A.

Carbon Nanotubes as Reinforcement Elements for AFM tips: Liquid Environment; Moreau, A.L.D.; Nakabayashi, D.B.; Ugarte, D.M.; Cotta, M.A.